

**Röntgenstrukturanalyse der
Tyrosin-Aminotransferase
aus *Trypanosoma cruzi*
bei 2.5 Å Auflösung**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von
Wulf Blankenfeldt
aus Ostercappeln

1. Referent:	Prof. Dr. Dr. h.c. Leopold Flohé
2. Referent:	Priv.-Doz. Dr. habil. Dirk Heinz
eingereicht am:	17. Juni 1999
mündliche Prüfung (Disputation) am:	20. August 1999

1999
(Druckjahr)

Für Onkel Ernst

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Nowicki, C.; Montmartini, M.; Hunter, G.R.; Blankenfeldt, W.; Kalisz, H. & Hecht, H.J. (1998). Crystallization and preliminary X-ray analysis of tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Cryst. D***54**, 105-107

Blankenfeldt, W., Nowicki, C., Montemartini-Kalisz, M., Kalisz, H.M. & Hecht, H.J. (1999). Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* tyrosine aminotransferase: substrate specificity is influenced by cofactor binding mode. Eingereicht Juni 1999 bei *Protein Science*

Tagungsbeiträge

Blankenfeldt, W.; Montemartini M.; Hunter, G.R.; Kalisz, H.M.; Nowicki C. & Hecht, H.J. (1998). Crystal Structure of Tyrosine Aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*. (Poster E3-P5), *ECM-18*, Prag, August 1998

Blankenfeldt, W. (1998). Crystal Structure of Tyrosine Aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*. (Vortrag). *1st Heart of Europe Meeting on Biocrystallography*, Eisenberg, Oktober 1998

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis meiner Bemühungen um die “Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften“, die mich vom Frühjahr 1995 bis zum Sommer 1999 in die Abteilung Stukturforschung der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig geführt haben. Mit zahlreichen Freunden und Kollegen innerhalb und außerhalb dieser Großforschungseinrichtung durfte ich während dieser Zeit meine wissenschaftlichen und wissenschaftsassozierten Probleme diskutieren, und ihnen allen schulde ich meinen Dank. Besonders verpflichtet fühle ich mich

Herrn Dr. Hans-Jürgen Hecht, der nicht nur immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und dabei stets das rechte Maß an Hilfestellung fand, sondern der mich durch die großzügige Überlassung des in dieser Arbeit vorgestellten Projektes überhaupt erst in die Lage versetzt hat, meine Promotion schließlich doch noch in Richtung Proteinstrukturaufklärung zu lenken;

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Leopold Flohé für die Bereitschaft, sich als Mentor zur Verfügung zu stellen und dieser Arbeit den letzten Schliff zu verleihen;

Herrn Priv.-Doz. Dr. habil. Dirk Heinz für die Übernahme des Koreferats;

Frau Prof. Dr. Cristina Nowicki von der Universidad de Buenos Aires in Argentinien für das in mich gesetzte Vertrauen, für zahlreiche gewinnbringende Diskussionen sowie den Willen, aufgeworfene Fragen durch persönlichen Einsatz im Labor zu beantworten;

Frau Dr. Marisa Montemartini-Kalisz und **Herrn Dr. Henryk M. Kalisz** für die Reinigung und Produktion von Tyrosin-Aminotransferase aus *Trypanosoma cruzi*-Epimastigoten und für viele hilfreiche Gespräche über biochemische Aspekte des Projekts;

Frau Sabine Weißflog für die Einarbeitung in Kristallisationstechniken und die Überlassung ihrer Ergebnisse mit *T. cruzi*-TAT;

Frau Dr. Angelika Rüdiger, **Frau Christiane Kamp** und **Frau Dipl.-Ing. Anke Waßmann** für die Aufnahme zahlreicher MALDI-Spektren und Hilfe bei deren Auswertung;

Frau Rita Getzlaff und **Herrn Dr. Michael Kieß** für Aminosäureanalysen und Ansequenzierungen mehrerer Proteinchargen, wenn ich mir mit Standardlabormethoden nicht mehr zu helfen wußte;

Herrn Dr. Klaus-Dieter Aumann und **Herrn Dr. Joachim Reichelt** für zahlreiche Hilfestellungen und die Erfüllung vieler Sonderwünsche im Umgang mit verschiedenen Computersystemen; und

Frau Dr. Birgit Hofmann und **Herrn Dr. Uwe Dengler** für ihre Kameradschaft und zahlreiche praktische Tips bei der Verfeinerung und Auswertung der TAT-Struktur.

Ziel einer Proteinstrukturaufklärung ist Aufklärung der Struktur eines Proteins. Daß sich die hierfür erforderlichen praktischen Voraussetzungen nicht immer im vorgestellten (und für einen Doktoranden auch vorgegebenen) Zeitrahmen realisieren lassen, habe ich in meiner Zeit an der GBF deutlich erfahren können. Ich bin dennoch sehr dankbar, daß ich während dieser Phase gute Freunde gewonnen habe, die mich außerdem in verschiedene Techniken zur Herstellung rekombinanter Proteine eingewiesen haben. Diese Personen sind **Frau Dr. Susanne Witt**, **Herr Dr. Thomas Schlüter** und **Herr Sergio Adrián Guerrero**.

Herrn Dr. Dirk Völkel, **Frau Kathrin Opolka** und **Frau Maja Grimm** danke ich für die gute und ehrgeizige Zusammenarbeit in jenem anderen Projekt.

Meinen Eltern danke ich für ihre Großzügigkeit und die Geduld, die sie in all den Jahren meiner Zeit in Braunschweig mit mir hatten;

“**Die Winklers**“ haben mich mit großer Unvoreingenommenheit aufgenommen und mir dadurch viel Unterstützung und Rückhalt gegeben.

Und schließlich danke ich Dir, liebe **Constanze**, dafür, daß Du in der ganzen Zeit an meiner Seite gestanden hast und immer bereit warst, Deine Gedanken mit mir zu teilen. Ohne Dich hätte ich nicht immer die Kraft gehabt, meinen eigenen Weg zu gehen.

Abkürzungen

a.i.	arbitrary intensity
AlkT	Alkyltransferase
ArAT	Aromaten-Aminotransferase (Aminotransferase für aromatische Aminosäuren)
AsAT	Aspartat-Aminotransferase
AT	Aminotransferase
AU	arbitrary units
CATH	Class Architecture Topology Homologous superfamily
CCD	charge-coupled device
CCP4	Collaborative Computational Project 4
Da	Dalton
DC	Decarboxylase
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DTT	D,L-Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunoglobulin G
kDa	Kilodalton
KTMB	α -Ketomethiobutyrat
LSQ	least squares
M	molar
MALDI	matrix assisted Laser desorption/ionisation
MD	Moleküldynamik
mM	millimolar
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MPG	Max-Planck-Gesellschaft
MS	Massenspektroskopie
NAD	Nicotinamiddinucleotid
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernresonanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol

PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PMP	Pyridoxamin-5'-Phosphat
SA	Simulated Annealing
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
TOF	time of flight
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
VSG	variable surface glycoprotein
WHO	World Health Organisation

Aminosäuren

Name	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Glu	E
Glutamat	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Phenylalanin	Phe	F
Methionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Inhalt

	Seite
I. Einleitung	1
I.1 Hintergrund	1
I.2 Chagas-Krankheit (Amerikanische Trypanomiasis)	1
I.3 Aminotransferasen	4
I.4 Tyrosin-Aminotransferase von <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
I.5 Ziele dieser Arbeit	12
II. Prinzipien der Röntgenstrukturanalyse	13
II.1 Ziel einer Proteinstrukturaufklärung	13
II.2 Methoden der Strukturaufklärung	15
II.3 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse:	
Streuung, Interferenz, Beugung, Auflösung	15
II.4 Kristalle	18
II.4.a Eigenschaften von Proteinkristallen	18
II.4.b Herstellung von Proteinkristallen	19
II.5 Das Beugungsbild von Kristallen	20
II.6 Die Bestimmung von $F_K(h\ k\ l)$	24
II.7 Der Informationsgehalt von $ F_K(h\ k\ l) $	25
II.7.a Raumgruppenbestimmung, Matthews-Parameter, Mosaizität	25
II.7.b Auflösung, Mittlerer Temperaturfaktor, Standardabweichung	26
II.7.c Pattersonfunktion, Selbstrotation	27
II.8 Die Bestimmung der Phase von $F_K(h\ k\ l)$	29
II.8.a Molekularer Ersatz	29
II.8.b Schweratommethode - Isomorpher Ersatz	31
II.9 Strukturverfeinerung	33
II.9.a Manuelle Verfeinerung	33
II.9.b Computerverfeinerung	33
II.9.b.1 Least-Squares Refinement	34
II.9.b.2 Maximum-Likelihood Refinement	35
II.9.b.3 Probleme bei der Computerverfeinerung	36
II.9.b.4 Elektronendichtemodifikation	39

Inhalt	b
III. Methoden	42
III.1 Proteinreinigung	42
III.2 Analytik	42
III.2.a Reinheit	42
III.2.b Konzentration	42
III.2.c Molekulargewicht	43
III.2.d N-terminale Sequenzierung	43
III.2.e Aggregationsstatus	43
III.2.f Enzymaktivität	44
III.3 Kristallisation	45
III.4 Aufnahme der Röntgendaten	47
III.4.a Ermittlung von Cryobedingungen	47
III.4.b Röntgenmessungen	48
III.4.c Datenindizierung, Integration und Reduktion	48
III.5 Selbstrotationssuche	49
III.6 Molekularer Ersatz	49
III.7 Schwermetallpositionssuche	49
III.8 Sequenzvergleiche	50
III.9 Verfeinerung	50
III.10 Elektronendichtekarten	52
III.11 Dichtemodifikation	53
III.12 Substratdocking	55
III.13 Erstellung eines Strukturmodells von humaner TAT	56
III.14 Bilder	56
IV. Ergebnisse und Diskussion	57
IV.1 Experimenteller Teil	57
IV.1.a Proteinanalytik	57
IV.1.b Nachreinigung	58
IV.1.c Kristallisation	59
IV.1.d Röntgenmessungen	61
IV.1.e Selbstrotationssuche	63
IV.1.f Molekularer Ersatz	64
IV.1.g Schwermetallpositionssuche	65
IV.1.h Sequenzvergleiche	67
IV.1.i Verfeinerung	67

VI.2 Struktureller Teil	72
IV.2.a Die Struktur von <i>T. cruzi</i> -TAT	72
IV.2.a.1 Das vollständige Molekül	72
IV.2.a.2 Die kofaktorbindende Domäne	74
IV.2.a.3 Die substratbindende Domäne	76
IV.2.a.4 Kontakte zwischen kofaktor- und substratbindender Domäne	78
IV.2.a.5 Kontakte zwischen den Monomeren	80
IV.2.a.6 Strukturbasiertes Sequenzalignment von <i>T. cruzi</i> -TAT und <i>E. coli</i> -AsAT	84
IV.2.b Das aktive Zentrum	88
IV.2.c Reaktionsmechanismus	93
IV.2.c.1 Historische Entwicklung	93
IV.2.c.2 Intermediate der Transaminierungsreaktion	94
IV.2.c.3 Einfluß des Proteins auf die Transaminierungsreaktion ...	97
IV.2.d Substratspezifität	103
IV.2.d.1 Präferenz für Tyrosin	109
IV.2.d.2 Diskriminierung von Dicarboxylatverbindungen und Aminosäuren mit verzweigter Seitenkette	112
IV.2.e Ein erster Blick auf die menschliche Tyrosin-Aminotransferase ...	118
IV.2.e.1 Vererbte Mutationen bei Richner-Hanhart-Syndrom	118
IV.2.e.2 Substratspezifität von humaner TAT	121
IV.2.f Einblicke in weitere Aminotransferasen mit unbekannter Struktur .	124
 V. Ausblick	 127
<i>T. cruzi</i> -TAT: ein neuer Angriffspunkt in der Bekämpfung der Chagas-Krankheit?	127
 VI. Zusammenfassung	 132
 VII. Literatur	 134

Anhang	i
A.1 Chemikalien	i
A.2 Verbrauchsmaterialien	iv
A.3 Laborgeräte	v
A.4 Röntgenmessungen	vi
A.5 Computer	vi
A.5.a Workstations	vi
A.5.b Personal Computer	vi
A.6 Sonstige Computerprogramme	vii
A.7 Kristallisations-Screens	viii
A.7.a Salz-Screen	viii
A.7.b PEG-Screen	ix
A.7.c Gemischter Screen	x

I. Einleitung

I.1 Hintergrund

Flagellierte Protozoen der Gattung *Trypanosomatidae* gehören zu den weitestverbreiteten humanpathogenen Parasiten in tropischen und subtropischen Gebieten. Sie werden durch Insekten übertragen und lösen verschiedene Formen der Leishmaniasis (z.B. Viszerale L. = Kala Azar; Kutane und Mukokutane L. = Weiße Lepra), die Afrikanische Trypanomiasis (Schlafkrankheit) oder die Amerikanische Trypanomiasis (Chagas-Krankheit) aus. Alle diese Krankheiten enden unbehandelt entweder tödlich oder besitzen extrem negative Folgen für das Opfer, sei es, weil sie es stark schwächen oder bleibende entstellende Schäden zurücklassen. Nach neueren Schätzungen ist davon auszugehen, daß ca. 30 Millionen Personen von den o.g. Erregern infiziert sind (WHO, 1998).

Die Behandlung von Trypanomiasis bzw. Leishmaniasis ist in allen Fällen schwierig. Die zur Verfügung stehenden Medikamente sind entweder ineffizient, so daß sie unmittelbar nach der Übertragung des Erregers angewendet werden müssen, und/oder sie besitzen sehr starke Nebenwirkungen. Es besteht daher ein großer Bedarf an der Entwicklung neuer, hochspezifischer Präparate zur Bekämpfung dieser Endoparasiten. Ein möglicher Ansatzpunkt hierfür ist die gezielte Ausnutzung von Unterschieden zwischen Stoffwechselwegen des Erregers und seines Wirtes.

Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist die Kenntnis von Enzymstrukturen aus dem ausgewählten Stoffwechselweg von sehr hohem Wert, denn hiermit kann rational nach potentiellen Pharmaka gesucht bzw. die Eigenschaften von Substanzen, die sich in Hochdurchsatz-Tests als mögliche Inhibitoren des untersuchten Proteins erwiesen haben, zielgerichtet verbessert werden. Der Erreger der Amerikanischen Trypanomiasis, *Trypanosoma cruzi*, produziert sehr große Mengen Tyrosin-Aminotransferase. Das Enzym erfüllt bei dem Parasiten mit großer Wahrscheinlichkeit eine vom analogen Protein des Menschen abweichende Funktion. Untersuchungen am verwandten Organismus *Crithidia fasciculata* haben ferner gezeigt, daß gegen die Tyrosin-Aminotransferaseaktivität gerichtete Inhibitoren das Wachstum von Zellkulturen stoppen können (Berger *et al.*, 1998). In *T. cruzi*-TAT besteht damit ein vielversprechendes Zielmolekül für neuartige Präparate in der Bekämpfung der Chagas-Krankheit.

I.2 Chagas-Krankheit (Amerikanische Trypanomiasis)

Mit etwa 18 Millionen Fällen bilden die von der Amerikanischen Trypanomiasis betroffenen Personen die größte Gruppe unter den Trypanomiasis- bzw. Leishmaniasis-Patienten. Die Krankheit findet sich ausschließlich in Süd- und Mittelamerika, wo etwa 100 Millionen Menschen bzw. 25 % der Gesamtbevölkerung der Gefahr einer Infektion ausgesetzt sind. Etwa

45000 Todesfälle werden zur Zeit pro Jahr registriert (WHO, 1998). Die Chagas-Krankheit wird durch blutsaugende Raubwanzen der Gattung *Triatoma*, *Rhodnius* und *Panstrongylus* übertragen. Als Hauptvektor fungiert *Triatoma infestans*, eine Wanzenart, die sich vorwiegend in Wandspalten einfacher Behausungen versteckt. Amerikanische Trypanomiasis ist folglich eng mit Armut assoziiert.

Zur Infektion kommt es, wenn nach dem Biß mit Trypomastigoten von *T. cruzi* infizierte Fäzes, die die Wanze in der Regel an der Einstichstelle zurückläßt, in die Wunde eingebracht werden. Auch durch Bluttransfusion kann eine Ansteckung erfolgen (Wendel, 1998). Nach der Übertragung tritt die Krankheit zunächst in eine akute Phase ein. Während dieser Zeit, die normalerweise ein bis zwei Monate dauert, stellt sich das Immunsystem des Wirtes auf den Parasiten ein, und es kommt zu Fieber und Entzündungserscheinungen. Bei Erwachsenen werden in dieser Phase jedoch oft überhaupt keine Symptome beobachtet.

Die eingedrungenen Trypomastigoten befallen Zellen verschiedener Gewebe, u.a. von Herz, Leber und Milz. Dort werden sie phagozytiert, können dann jedoch intrazellulär persistieren, da sie verschiedene Verteidigungsmöglichkeiten gegen die Abwehrmechanismen des Wirtes besitzen. Im Zellinneren vermehren sie sich als Amastigoten, die über eine epimastigote Entwicklungsstufe zu Trypomastigoten, der frei im Blut zirkulierenden Form des Parasiten, heranreifen. Nach dem Platzen einer infizierten Zelle können die freien Trypomastigoten neue Zellen befallen oder wiederum vom Insektenvektor bei einer Blutmahlzeit aufgenommen werden. Im Mitteldarm des Insekts vermehren sich die Parasiten als Epimastigoten, um im Enddarm wiederum zu infektiösen metazyklischen Trypomastigoten heranzureifen (Zum Lebenszyklus der Parasiten sowie einigen Aspekten der Chagas-Krankheit: Lucius & Loos-Frank, 1997; Hausmann & Hülsmann, 1996).

Sobald beim Menschen die Anpassung des Immunsystems an die Infektion erfolgt ist, geht die Krankheit in eine latente Periode über. Der Parasit ist während dieser Zeit nicht nur durch Internalisierung in Zellen des Wirtes vor einer Immunantwort geschützt, sondern es gibt auch Hinweise, daß das Abwehrsystem des Wirtes bei der Infektion mit *T. cruzi* aktiv unterdrückt wird (zusammengefaßt von Reed, S.G., 1998). Diese Strategie unterscheidet sich grundlegend von der afrikanischer Trypanosomen (*Trypanosoma brucei gambiense* bzw. *rhodesiense*), den Auslösern der Schlafkrankheit. Diese werden nicht internalisiert, sondern rufen durch Veränderung ihrer VSG-Oberflächenproteine (VSG = variable surface glycoprotein) eine ständig neue Immunantwort hervor, so daß es zu immer neuen Fieberschüben kommt, weil sich das Immunsystem auf immer neue Varianten des Parasiten einstellen muß. Gleichzeitig bleiben diese durch die Veränderung ihrer Antigenität gegen eine Elimination durch das Immunsystem des Wirtes geschützt.

Während der latenten Phase der Chagas-Krankheit ist die Anzahl der *T. cruzi*-Trypomastigoten

im Blut nur sehr gering. Typischerweise im Laufe von 10 bis 20 Jahren treten dann chronische Symptome der Infektion hervor: bei etwa einem Drittel aller Fälle kommt es zu einer kardiologischen Form, 8 bis 10 % entwickeln eine gastro-intestinale Variante und bei wenigen Patienten wird das periphere Nervensystem abgebaut. Bei kardiologischem und gastro-intestinalen Verlauf werden Megabildungen der betroffenen Organe, wahrscheinlich verursacht durch die Zerstörung des assoziierten Nervengewebes, beobachtet. Ein vergrößertes Herz kann das Blut nicht mehr effizient pumpen, so daß die Krankheit oft im Tod durch Herzversagen endet. In der gastro-intestinalen Variante führen Megaösophagus und Megakolon zu erheblichen Verdauungsstörungen.

Es ist wahrscheinlich, daß es sich bei den neurologischen Schäden um die Folge von Autoimmunreaktionen handelt. Mehrere Antigene von *T. cruzi* führen zur Produktion von Antikörpern, die auch mit menschlichen Proteinen reagieren. Im Falle eines 160 kDa-Proteins aus der Geißeltasche des Parasiten (FL-160) wurden Antikörper mit Kreuzreaktivität zu einem 48 kDa-Protein aus Nervengewebe gefunden (Van Voorhis *et al.*, 1991). Antikörper gegen das ribosomale P0-Protein von *T. cruzi* binden auch eine Domäne des β_1 -adrenergen Rezeptors von Herzmuskelzellen, wodurch es zur Verlangsamung der Herzfrequenz kommt (Ferrari *et al.*, 1995). Die genauen Pathogenitätsmechanismen der Autoimmunphänomene in Chagas sind allerdings Gegenstand einer laufenden Debatte (Kierzenbaum, 1999; Tarleton & Zhang, 1999).

Die Behandlung der Amerikanischen Trypanomiasis mit den zur Verfügung stehenden Medikamenten muß in jedem Fall im akuten Stadium der Krankheit erfolgen, wenn der Patient vollständig vom Parasiten befreit werden soll. Verwendet werden im Augenblick das Nitroimidazolderivat Benznidazol (Roche: Rochagan®) und das Nitrofuranderivat Nifurtimox (Bayer: Lampit®), von denen letzteres allerdings kürzlich wieder vom Markt genommen wurde. Die Wirkung von Nifurtimox beruht offenbar auf der Reduktion seiner Nitrogruppe durch eine Nitroreduktase. Das entstehende Nitroanionradikal erzeugt durch Reaktion mit Sauerstoff Superoxidradikale $\cdot\text{O}_2^-$ und setzt den Parasiten somit einem oxidativen Streß aus (Docampo *et al.*, 1981). Eine analog wirkende Nitroreduktase kommt beim Menschen nicht vor, so daß das Präparat zunächst nur auf den Parasiten Einfluß nimmt. Das zweite Medikament Benznidazol scheint hingegen keinen direkten oxidativen Schaden anzurichten. Vielmehr stört es die Synthese von Makromolekülen durch Bildung kovalenter Intermediate, oder es kommt durch andere Wechselwirkungen von Nitroreduktionsintermediaten mit verschiedenen Zellkomponenten wie DNA, Lipiden oder Proteinen zu einer Abtötung des Parasiten (Diaz de Toranzo *et al.*, 1988). Da beide Präparate nur eine geringe Wirksamkeit besitzen und somit in hohen Dosen über einen langen Zeitraum angewendet werden müssen, sind die von ihnen ausgelösten heftigen neuropathischen und dermatologischen Nebenwirkungen sehr problematisch. Zudem stehen

Nifurtimox und Benznidazol im Verdacht, cancerogen zu sein (Nagel, 1987; Souza *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1990).

Eine Impfung gegen *T. cruzi* existiert noch nicht, obwohl im Tiermodell Teilerfolge vorzuweisen sind (z.B. Araujo *et al.*, 1999; Wizel *et al.*, 1998). Die effektivste Waffe gegen die Chagas-Krankheit besteht daher zur Zeit in der Bekämpfung des Insektenvektors. So ist es z.B. Uruguay nach offiziellen Angaben in den Jahren 1985 bis 1996 durch Insektizideinsatz gelungen, die Gefahr einer Neuinfektion vollständig zu unterdrücken (WHO, 1998). Da chronische Fälle jedoch bisher nicht geheilt werden können, bleibt die Krankheit mit den ca. 18 Millionen bereits infizierten Opfern für die nächsten Jahrzehnte ein Problem, zumal auch Tiere mit *Trypanosoma cruzi* infiziert sein können, so daß hier auch in der Zukunft ein schwer zu kontrollierendes Parasitenreservoir existiert.

Es besteht folglich weiterhin ein großer Bedarf an neuen Wirkstoffen. Zur rationalen Entwicklung solcher Präparate sind mehrere Ansatzpunkte im Gespräch: vorgeschlagen wurden Cruzipain (= Cruzain), eine Cystein-Protease, die für das Überleben des Parasiten in den Wirtszellen wichtig erscheint (McGrath *et al.*, 1995), Topoisomerase I und II (Bodley & Shapiro, 1995; Douc-Racy *et al.*, 1986) sowie komplette Stoffwechselsysteme, in denen sich der Parasit stark von seinem Wirt unterscheidet. Zu nennen sind hier die Sterolbiosynthese (Urbina, 1999), die Glycolyse (Eisenthal & Cornish-Bowden, 1998; Aronov *et al.*, 1999) sowie die Enzyme zur Synthese und zum Umsatz von Trypanothion, einem von Trypanosomatiden zur Peroxiddetoxifikation verwendeten Molekül (Flohé, 1998). Erste Ergebnisse mit einigen auf dieser Grundlage entwickelten Inhibitoren sind sehr vielversprechend (z.B. Urbina, 1999; Aronov *et al.*, 1999).

I.3 Aminotransferasen

Aminotransferasen (EC 2.6.1.x) katalysieren den reversiblen Austausch einer Aminogruppe gegen eine Oxofunktion unter Verwendung des Kofaktors Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP), einem Derivat des Pyridins.

PLP wird im Laufe der Reaktion zu Pyridoxamin-5'-Phosphat (PMP) umgesetzt. PLP und PMP sind die wichtigsten Derivate der Verbindung, die in einer reduzierten und dephosphorylierten Stufe (Pyridoxol) als Vitamin B₆ bezeichnet wird.

Der Kofaktor ist in der Lage, neben der in Abb. I.1 gezeigten Transaminierung noch viele andere Umsetzungen wie z.B. Razemisierungen, α -Decarboxylierungen, Aldolspaltungen, β - und γ -Eliminierungen oder Substitutionsreaktionen zu katalysieren, da diese Reaktionen zum Teil über gleiche Zwischenstufen verlaufen, bevor sich der Reaktionsmechanismus verzweigt und die letzten Schritte über das endgültige Produkt entscheiden. Eine mechanistische Ausnahme bilden die ebenfalls PLP-abhängigen Glycogen-Phosphorylasen, bei denen die Umsetzung auf einem völlig anderen Prinzip beruht.

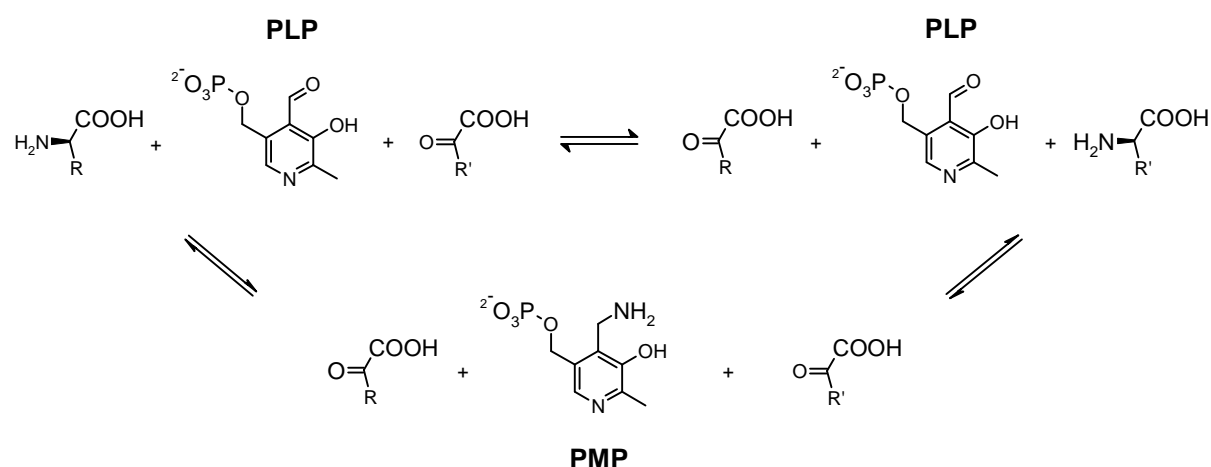


Abb. I.1: PLP-katalysierte Transaminierungsreaktion

Pyridoxal-5'-Phosphat ist von der Natur mehrfach als Koenzym akquiriert worden. Dies kann aus den unterschiedlichen Faltungen von Vitamin-B₆-Proteinen geschlossen werden. Fünf Topologien sind bisher strukturell charakterisiert, und die Existenz von mindestens zwei weiteren Faltungsfamilien wird postuliert (Grishin *et al.*, 1995). Innerhalb dieser Gruppen ist die Sequenzidentität der Mitglieder nur sehr gering, so daß es oft schwierig ist, Proteine anhand ihrer Primärstruktur in eine der Faltungsfamilien einzuordnen. Zur Klassifizierung der PLP-bindenden Enzyme wurden daher verschiedene Systeme vorgeschlagen, die nicht immer die gleichen Proteine zu einer Familie zusammenführen (Jansonius, 1998). Eine Einordnung kann z.B. anhand der Position der in der Umsetzung gespaltenen Bindung erfolgen. Hiernach muß zwischen einer α -, einer β - und einer γ -Familie unterschieden werden (Alexander *et al.*, 1994). Zur Zeit der Entwicklung dieser Systematik war noch nicht bekannt, daß die γ -Familie eine zur α -Familie identische Topologie besitzt. Mehta *et al.* schlagen für die als Aminotransferasen einzustufenden Enzyme aufgrund von Sequenz- und Profilanalysen eine Einteilung in vier Klassen vor und identifizieren die in jeder Klasse konservierten Aminosäurereste (Mehta *et al.*, 1993). Nachdem mittlerweile für jede dieser Klassen zumindest eine Proteinstruktur aufgeklärt wurde, zeigt sich, daß die Klassen I, II und IV trotz sehr geringer Sequenzverwandtschaft zur gleichen Faltungsfamilie gehören. Mittlerweile wurden die Aminosäuresequenzen von weit über 1000 PLP-bindenden Proteinen ermittelt. Mit einem derartigen Anwachsen von Sequenzinformationen wurde erkennbar, daß die von Mehta *et al.* vorgeschlagenen Klasse I nochmals in zunächst sieben Unterfamilien aufgespalten werden kann (Jensen & Gu, 1996). Eine Teilübersicht für die Klassifizierungssysteme gibt Abb. I.2.

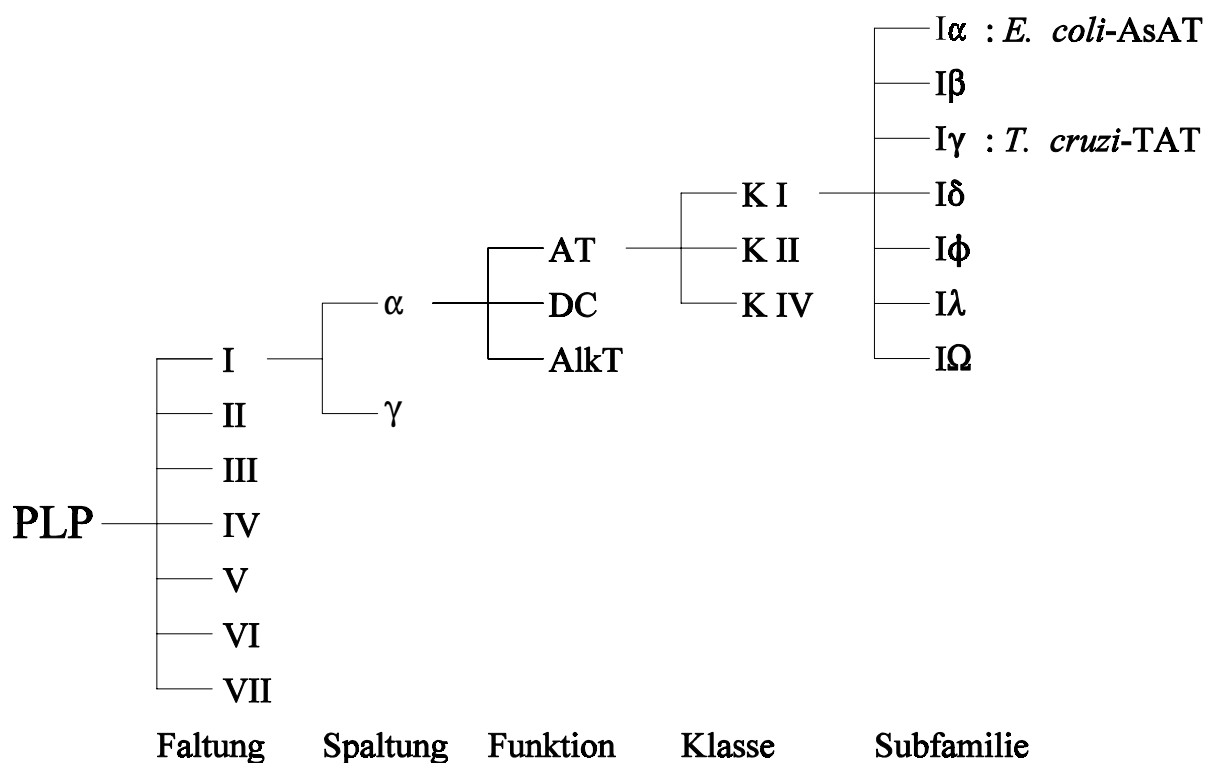


Abb. I.2: Einteilung PLP-abhängiger Enzyme mit besonderer Berücksichtigung der Klasse I-Aminotransferasen. AT: Aminotransferasen, DC: Decarboxylasen, AlkT: Alkyltransferasen, K: Klasse. *T. cruzi*-TAT und *E. coli*-AsAT spielen in dieser Arbeit eine wichtige Rolle und sind deswegen explizit genannt.

Strukturell bilden die PLP-bindenden Enzyme eine extrem gut charakterisierte Gruppe: von insgesamt ca. 10000 Einträgen in der Strukturdatenbank PDB (Sussman *et al.*, 1998) enthalten ca. 160 dieses Molekül (Frühjahr 1999). Allerdings ist in dieser Zahl eine sehr hohe Redundanz enthalten, denn bei ca. 70 Einträgen handelt es sich um eine Struktur von Aspartat-Aminotransferase (AsAT, EC 2.6.1.1), dem bei weitem bestuntersuchten PLP-abhängigen Enzym. Sie gehört zum Faltungstyp I, funktionell zur α -Familie und nach ihrer Sequenz zur Aminotransferase-Klasse I, Subfamilie α . Bei der Überrepräsentation von PLP-Enzymen ist es überraschend, daß in der AT-Klasse I bisher keine Strukturen außerhalb von Subfamilie α bestimmt worden sind.

Aminotransferasen der Klasse I sind in der Regel homodimere Moleküle mit zwei aktiven Zentren, zwischen denen trotz der Beteiligung von Aminosäuren aus beiden Monomeren keine allosterische Wechselwirkung besteht. Die Einzelkette faltet in zwei Domänen, die sich bei Anbindung eines Substratmoleküls aufeinander zu bewegen, so daß zwischen offenen und geschlossenen Strukturen zu unterscheiden ist (Abb. I.3).

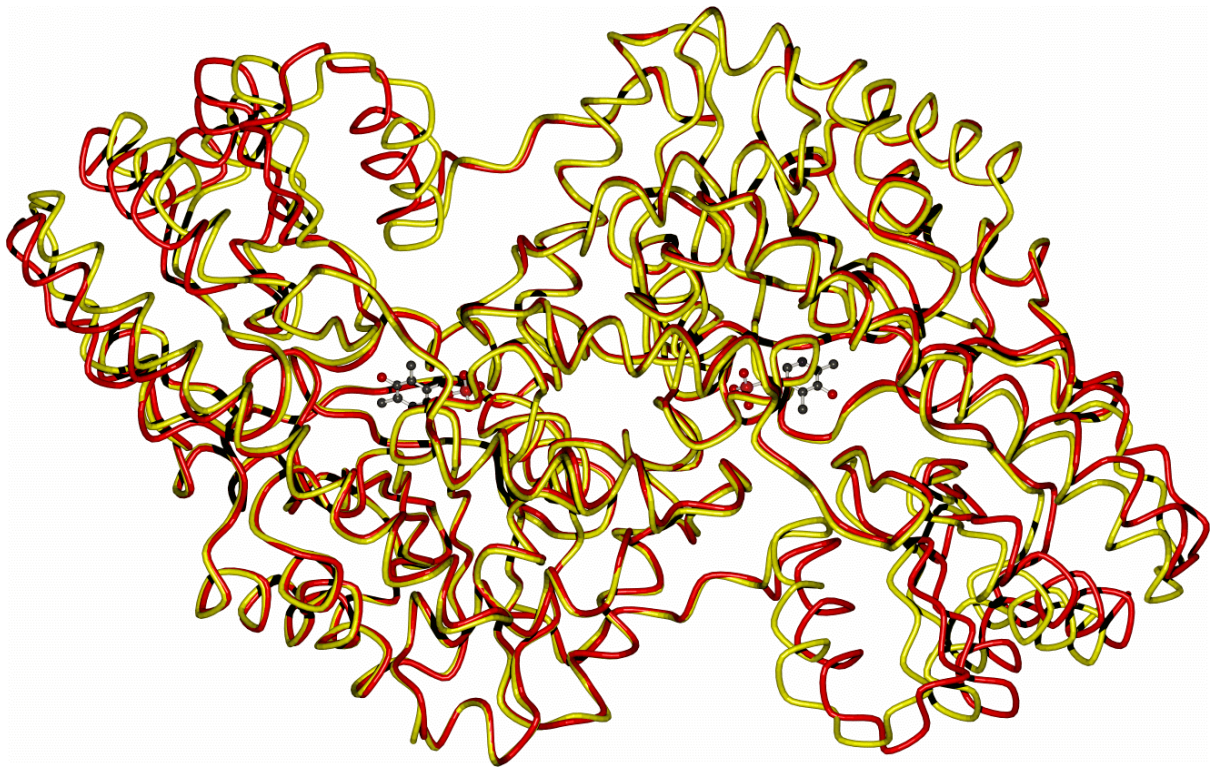


Abb. I.3: Offene (rot) und geschlossene (gelb) Struktur von *E. coli*-AsAT (Okamoto *et al.*, 1994).

PLP-abhängige Enzyme sind an allen Stoffwechselwegen, in denen Aminogruppen oder aminogruppentragende Moleküle umzusetzen sind, beteiligt. Klasse-I-Aminotransferasen, die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, finden sich bei Säugetieren normalerweise in der Leber, wo sie als katabole Enzyme den Abbau von überschüssigen Aminosäuren initiieren.

I.4 Tyrosin-Aminotransferase von *Trypanosoma cruzi*

Epimastigoten von *Trypanosoma cruzi*, dem Erreger der Amerikanischen Trypanomiasis, produzieren sehr große Mengen an Tyrosin-Aminotransferase (EC 2.6.1.5). Etwa 3 % des löslichen Proteins macht dieses Enzym aus (Montemartini *et al.*, 1993). Der hohe Anteil korrespondiert mit der großen Zahl von ca. 70 Genkopien, die der Parasit für die Aminotransferase besitzt (Bontempi *et al.*, 1993). Es ist davon auszugehen, daß die Tyrosin-Aminotransferase auch in anderen Formen von *T. cruzi* hoch konzentriert ist, denn dieser Parasit ändert, im Gegensatz zu afrikanischen Trypanosomen, seinen Metabolismus in den verschiedenen Entwicklungsstadien nicht wesentlich (Gutteridge & Rogerson, 1979).

Auch bei einigen *Leishmania*-Spezies (Chatterjee & Gosh, 1957; Fair *et al.*, 1971; Le Blanq & Lanham, 1984) sowie bei den verwandten Trypanosomatiden *Crithidia fasciculata* (Constansas

et al., 1971) und *T. brucei gambiense* (Stibbs & Seed, 1975a) wurden ungewöhnlich hohe Aktivitäten für die Transaminierung aromatischer Aminosäuren beobachtet. *T. cruzi* exkretiert die Produkte dieser Reaktion ins Kulturmedium (Montemartini *et al.*, 1994a), und bei afrikanischen Trypanosomiasen wurden große Mengen kataboler Produkte von aromatischen Aminosäuren im Urin der infizierten Säuger nachgewiesen (Stibbs & Seed, 1975b; El Sawalhy *et al.*, 1998). Bei Kamelen, die unter der “Surra” leiden (*T. evansi*-Infektion), wurde der Nachweis von trypanosomaler Tyrosin-Aminotransferaseaktivität als Krankheitsdiagnose vorgeschlagen (El Sawalhy & El-Sherbini, 1997).

Die Sequenzanalyse von *T. cruzi*-TAT zeigt mit einer Identität von ca. 41 % eine deutliche Verwandtschaftsbeziehung zu den Tyrosin-Aminotransferasen von Mensch und Ratte auf (Abb. I.4).

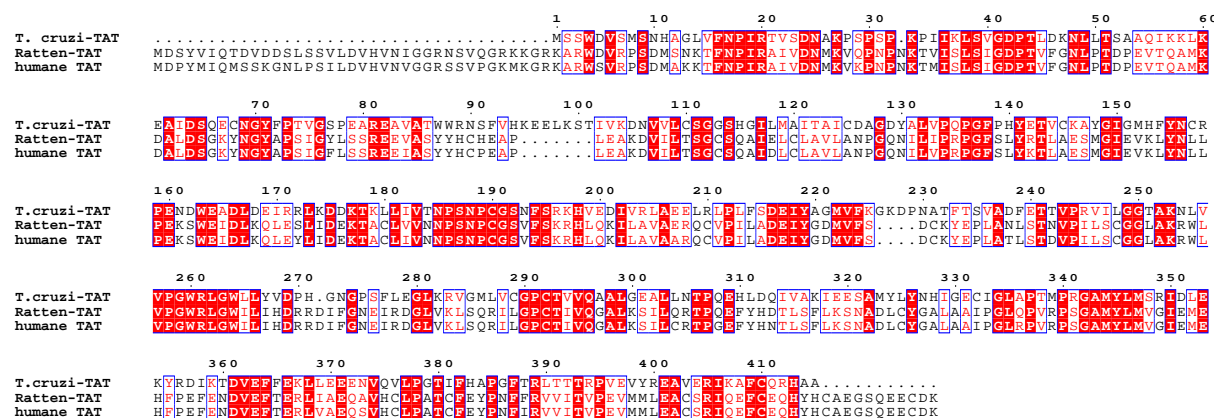


Abb. I.4: Tyrosin-Aminotransferasen von *T. cruzi*, Ratte und Mensch. Die Einfärbung erfolgte mit Hilfe einer Substitutionshäufigkeitsmatrix.

Bei diesen ist das Enzym im Zytosol von Leberzellen lokalisiert, wo es den ersten Schritt im Abbau von Tyrosin katalysiert. Die Transkription des TAT-Gens wird bei ihnen durch Glucocorticoide induziert (Dietrich, 1992). Eine vererbte Tyrosin-Aminotransferasedefizienz führt beim Menschen zum Richner-Hanhart-Syndrom (Tyrosinämie Typ II; Richner, 1938; Hanhart, 1947; Fellman *et al.*, 1967).

Die großen Mengen von TAT und die Beobachtung, daß gegen das entsprechende Enzym von *Crithidia fasciculata* gerichtete Inhibitoren Kulturen dieses Parasiten absterben lassen (Berger *et al.*, 1998), deuten darauf hin, daß das Enzym eine Sonderstellung im Metabolismus der Trypanosomatiden einnimmt. Allerdings ist seine genaue Aufgabe im Parasiten nicht bekannt. Diskutiert werden neben einer Beteiligung an der parasiteninduzierten Immunsuppression (Seed *et al.*, 1983), eine Rolle im Energiestoffwechsel (Montemartini *et al.*, 1994a/b) sowie eine Funktion in der Polyaminbiosynthese (Berger *et al.*, 1996).

Die älteste dieser drei Hypothesen beruht darauf, daß Tryptophol (3-Indolethanol), ein kataboles Derivat vom ebenfalls durch TAT transaminierbaren Tryptophan, bei Mäusen kreislaufberuhigend wirken und die Immunabwehr herunterregulieren kann (Tizard *et al.*, 1978; Ackerman & Seed, 1976; in anderem Zusammenhang: Munn *et al.*, 1998).

Eine Funktion im Energiestoffwechsel läßt sich vermuten, da diesbzgl. prinzipielle Unterschiede zu Säugern bestehen. Trypanosomatiden besitzen eine spezielle Organelle, das Glycosom, in dem in mehreren Schritten die Umsetzung von Glucose zu 2-Phosphoglycerat stattfindet, das anschließend ins Zytosol ausgeschleust wird. Gleichzeitig wird NAD^+ zu NADH reduziert. Da die an diesen Schritten beteiligten Enzyme Hexokinase und Phosphofructokinase nicht wie bei der Glycolyse in Säugerzellen durch Produkte des Stoffwechselweges inhibiert werden, setzen die Trypanosomatiden sehr viel Glucose um. In *T. cruzi* wird die nachgeschaltete Pyruvatkinase durch Fructose-2,6-Bisphosphat aktiviert, so daß aus dem 2-Phosphoglycerat große Mengen Pyruvat entstehen. Der wahrscheinliche Grund für den hohen Glucoseumsatz ist, daß bei den Trypanosomatiden Zitratzyklus und Atmungskette wesentlich weniger effektiv arbeiten als bei Säugern, die mit diesen Kreisläufen aus dem glycolytisch entstandenen Pyruvat große Mengen an Energie in Form von ATP gewinnen (zusammengefaßt in Cazzulo *et al.*, 1985; Cazzulo, 1992). Um den großen Umsatz an Glucose aufrecht erhalten zu können, brauchen die Parasiten wirksame Wege zur Reoxidation von NADH, die ergänzend zur Atmungskette wirken. An einem dieser Wege ist möglicherweise die Tyrosin-Aminotransferase beteiligt: In *T. cruzi* wird das Pyruvat weiter zu Alanin umgesetzt und ausgeschieden. Alanin kann in hoher Konzentration im Blut des Wirtes bzw. im Kulturmedium nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß Pyruvat und Tyrosin das beste Substratpaar von *T. cruzi*-TAT bilden und ebenfalls große Mengen an Stoffwechselprodukten aromatischer Aminosäuren von den Parasiten abgegeben werden, legt einen Zusammenhang nahe. Bei den Kataboliten der aromatischen Aminosäuren handelt es sich aber nicht um α -Ketoverbindungen, sondern um die korrespondierenden Lactate. Nach der Transaminierung muß also noch ein Reduktionsschritt stattfinden. In der Tat wurde in *T. cruzi* eine NADH-abhängige Lactat-Dehydrogenase, die aromatische α -Ketoverbindungen unter Erzeugung von NAD^+ reduziert (Montemartini *et al.*, 1994a). Ein weiterer Weg für die NADH-Reoxidation besteht für *T. cruzi* in der Produktion von Succinat, das ebenfalls zu den ausgeschleusten Endprodukten von Trypanosomatiden gehört (Cazzulo, 1992).

Die neueste der drei Hypothesen ordnet TAT schließlich in den Syntheseweg von Trypanothion ein. Dieses Molekül besteht aus zwei Glutathioneinheiten, die über Spermidin (N-(3-Aminopropyl)-1,4-butandiamin) miteinander verknüpft sind, und dient den Trypanosomatiden zur Peroxiddetoxifikation (Nogoceke *et al.*, 1997). Da Trypanothion bisher fast ausschließlich in Trypanosomatiden, keinesfalls aber in Säugern nachgewiesen wurde (Fairlamb *et al.*, 1985; Ondarza *et al.*, 1997; Montrichard *et al.*, 1999) und für den Parasiten, der sich gegen die

oxidativen Verteidigungsmechanismen des Immunsystems im Wirt wehren muß, lebenswichtig ist, stellen alle Proteine des Trypanothionstoffwechsels attraktive Ziele für die rationale Wirkstoffentwicklung dar (Flohé, 1998). Der Beitrag von TAT an der Trypanothionsynthese läge in der Reduktion von α -Ketomethiobutyrat (KTMB) zu Methionin, welches über S-Adenosylmethionin (SAM) einen Teil seines Kohlenstoffgerüsts für die Spermidinsynthese abgibt. Aus der thiomethylierten Ribosegruppe von SAM entsteht anschließend in einer Mehrstufensynthese wieder KTMB, das erneut zu Methionin umgesetzt wird (Abb. I.5).

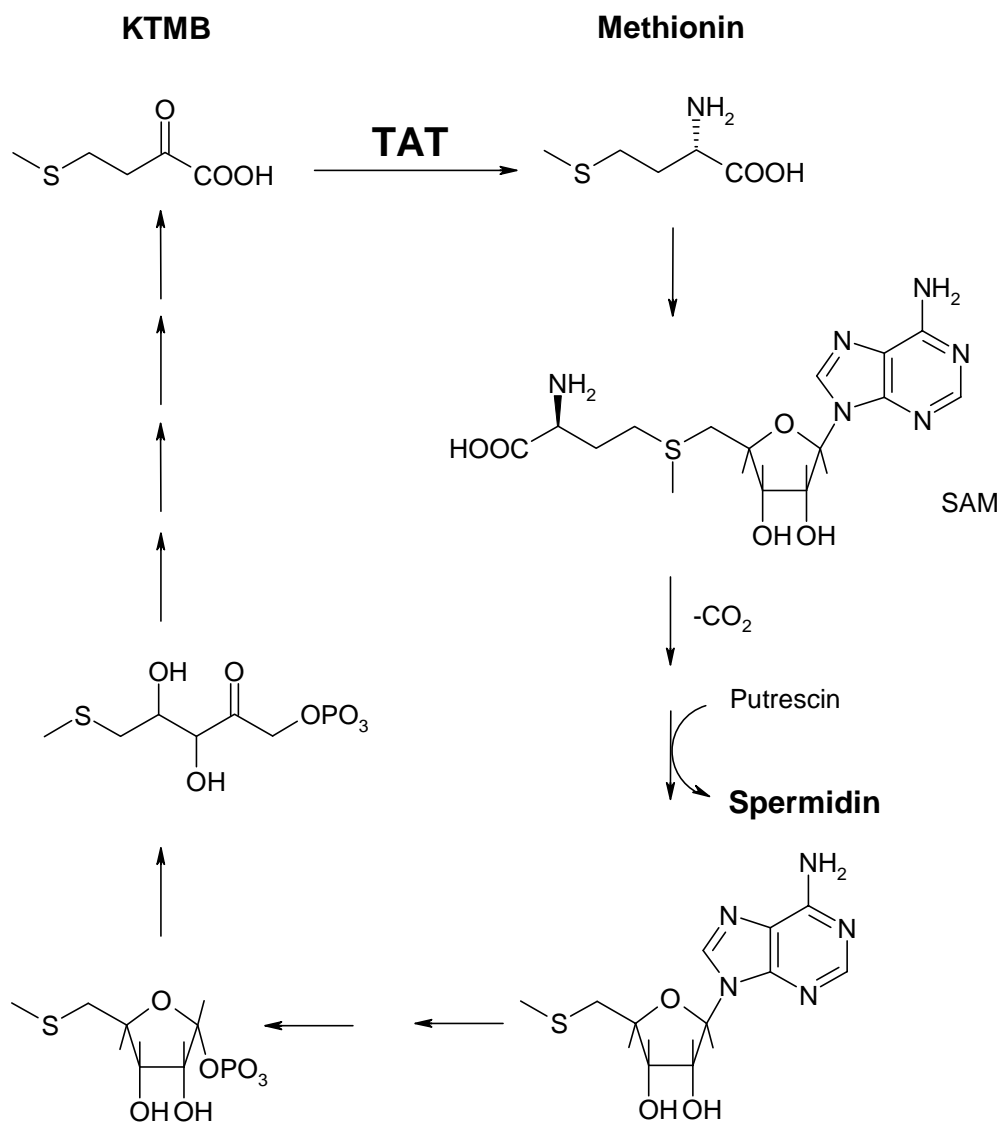


Abb. I.5: Mögliche Beteiligung von TAT an der Spermidinsynthese. SAM: S-Adenosylmethionin, KTMB: α -Ketomethiobutyrat. Nach Berger *et al.*, 1996

T. cruzi-TAT kann KTMB mit guter Effizienz reduzieren (Nowicki, 1999), und auch in *T. brucei brucei* und *C. fasciculata* scheint ein Zusammenhang zwischen TAT und KTMB zu bestehen. Allerdings wurden die Experimente hier nur mit Zellhomogenaten und nicht mit gereinigtem Enzym durchgeführt (Berger *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1998). Sollte die Funktion von *T. cruzi*-TAT tatsächlich im Biosyntheseweg von Spermidin angesiedelt sein, so wäre in einem entsprechenden Präparat ein Pendant zu Eflornithin (Ordinyl®) zu sehen. Dieses Medikament wird seit ca. 1980 in der Behandlung der Afrikanischen Trypanomiasis eingesetzt (Croft, 1997). Bei Eflornithin handelt es sich um einen Inhibitor von Ornithin-Decarboxylase, einem ebenfalls PLP-abhängigen Enzym, das Putrescin, den zweiten Aminbaustein für die Spermidinsynthese, liefert.

Es besteht die Möglichkeit, daß sich mehrere der genannten Aufgaben für *T. cruzi*-TAT überschneiden. In jedem Fall weicht die Funktion des Enzyms von derjenigen der verwandten menschlichen Tyrosin-Aminotransferase ab.

I.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von *T. cruzi*-TAT unter Verwendung kristallografischer Methoden. Die Struktur soll Informationen für die Inhibitorentwicklung zur Verfügung stellen, Erklärungsansätze für einige Eigenschaften des Enzyms liefern sowie einen fundierten Vergleich mit verwandten Proteinen bekannter und unbekannter Struktur ermöglichen:

Ein zuverlässiges Sequenzalignment zwischen den Aminotransferase-Subfamilien I α und I γ soll durch die Überlagerung von *T. cruzi*-TAT mit der Struktur von *E. coli*-AsAT hergestellt werden. Ferner sollen Strukturelemente aus *T. cruzi*-TAT in Aminotransferasen aus anderen, kristallografisch bisher nicht untersuchten Subfamilien der Klasse I identifiziert werden.

Der Substratbindungsmodus von *T. cruzi*-TAT soll auf der Grundlage kristallografischer Experimente und theoretischer Ansätze ermittelt werden, um hieraus die Substratspezifität des Proteins zu rationalisieren. Solche Informationen sind für die Entwicklung von Wirkstoffen, die gegen das Protein gerichtet sind, von hoher Bedeutung, denn sie gestatten den gezielten Eingriff in das Bindungsverhalten dieser Moleküle.

Ein einfaches Modell der humanen Tyrosin-Aminotransferase soll aus der *T. cruzi*-TAT-Struktur erzeugt werden. Das menschliche Protein weist mit einer Sequenzidentität von ca. 41 % eine eindeutige Verwandtschaft zum Enzym aus *Trypanosoma cruzi* auf, ist bisher aber strukturell nicht charakterisiert. Aus dem Modell soll der Effekt von Punktmutationen, die beim Menschen das Richner-Hanhart-Syndrom auslösen, vorhergesagt werden. Außerdem soll das Modell zur Erklärung des leicht veränderten Substratspektrums von humaner TAT dienen. Diese Ergebnisse können erste Ansatzpunkte für die Auswahl neuartiger Leitmoleküle in der Bekämpfung der Chagas-Krankheit liefern.

II. Prinzipien der Röntgenstrukturanalyse

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit den Grundbegriffen der Proteinstrukturaufklärung mittels Röntgenlicht. Umfassendere Herleitungen der angegebenen physikalischen Gesetze finden sich u.a. in den Lehrbüchern von J. Drenth und C. Giacovazzo sowie in der zitierten Originalliteratur. In Fällen, in denen die Beschreibung lediglich zur Abgrenzung einer experimentellen Variante dient, wird auf das nächste Kapitel (III. Methoden) verwiesen.

II.1 Ziel einer Proteinstrukturaufklärung

Proteine sind polymere Moleküle, die aus miteinander über eine Säureamidbindung verknüpften α -L-Aminosäuren aufgebaut sind.

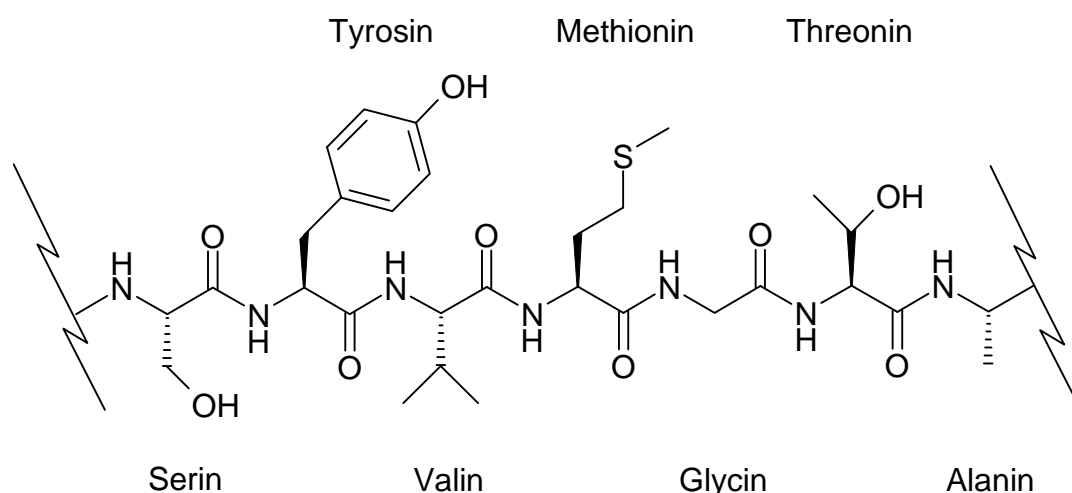


Abb. II.1: Exemplarischer Ausschnitt aus einer Proteinkette

Die Abfolge der Aminosäuren ergibt sich aus der Basensequenz des zum Protein gehörenden Gens und lässt sich mit chemischen Methoden sowohl aus dem Protein als auch aus dem Gen (ungeachtet nach der Translation stattfindender Modifikationen) bestimmen. Da im genetischen Code lediglich eine begrenzte Zahl verschiedener Aminosäuren verschlüsselt wird, könnte sich eine “Strukturaufklärung” bei flüchtiger Betrachtung auf die Ermittlung dieser sog. Primärstruktur unter Berücksichtigung der bekannten Stereochemie von Aminosäuren beschränken. Vom Standpunkt des Syntheschemikers, der Moleküle in der Regel nach funktionellen Gruppen und den ihnen innewohnenden Reaktionsmöglichkeiten charakterisiert, wäre eine solche Struktur nicht interessant, denn die einzelnen Bausteine unterscheiden sich lediglich durch mehr oder weniger unreaktive “Seitenketten”, und auch die einzelnen Peptidbindungen zwischen den

Aminosäuren lassen kein besonderes Reaktionsvermögen vermuten. Hinzu kommt noch, daß die an kleinen Molekülen gesammelte Erfahrung freie Drehbarkeit um Einfachbindungen suggeriert. Ein Protein wäre demzufolge ein hochflexibles Molekül, das im größten Teil seiner internen Freiheitsgrade unbestimmt ist.

Gegen diese Einschätzung sprechen allerdings zwei Beobachtungen:

- 1.) Proteine erfüllen in lebenden Organismen verschiedenste Aufgaben. In der enzymatischen Katalyse z.B. beschleunigen sie chemische Reaktionen mit hoher Spezifität hinsichtlich der Reaktionspartner. Von einem Molekül, dem ein extrem großer Konformationsraum mit einem zugehörigen flachen Energiehyperflächenprofil offen steht, ist keine derartige Spezifität zu erwarten.
- 2.) Die Gene für viele Proteine finden sich in mehr oder weniger stark abgewandelter Form in allen lebenden Organismen wieder, was auf einen gemeinsamem Ursprung des Lebens vor einigen hundert Millionen Jahren hindeutet. Wäre die vom jeweiligen Protein erfüllte Aufgabe nicht wichtig für den Organismus und wäre in den "Bauplänen" nicht eine Information enthalten, die die Spezifität der Proteine begründet, so wäre die genetische Information nicht in verwandter Form erhalten bzw. ganz verloren gegangen.

Tatsächlich gehorchen natürliche Proteine einem höheren Ordnungsprinzip, denn sie besitzen eine definierte räumliche Faltung (Tertiärstruktur genannt) mit sehr begrenzter Flexibilität. Sie ergibt sich durch die Aneinanderlagerung von kleineren Konformationsmotiven, den Sekundärstrukturelementen wie α -Helix oder β -Faltblattstrang, die durch bestimmte Wasserstoffbrückenbindungsmuster und Hauptkettentorsionswinkelkombinationen voneinander abzugrenzen sind. Bei der Vereinigung mehrerer gefalteter Ketten zu einem Proteinkomplex liegt eine Quartärstruktur vor. Nach allgemein akzeptierter Hypothese (Anfinsen, 1973) repräsentiert die native Struktur des Proteins in seiner natürlichen Umgebung den thermodynamisch günstigsten Zustand und ist daher nur durch die Aminosäuresequenz bestimmt.

In einer räumlichen Struktur kommen sich sequenziell weit voneinander entfernte Gruppen nahe und bauen dadurch neue Reaktivitätsmuster, beispielsweise in Form eines aktiven Zentrums oder einer Bindungsstelle für andere Moleküle, auf. Um beantworten zu können, warum und wie ein Protein seine spezifische Aufgabe erfüllt, ist es also nötig, die relative räumliche Anordnung seiner Atome zu bestimmen. Hierfür muß auf experimentelle Methoden zurückgegriffen werden, da zwar die treibende Kraft hinter dem Faltungsvorgang bekannt (der hydrophobe Effekt; s. Tanford, 1962), eine Strukturvorhersage ausgehend von der Aminosäuresequenz

jedoch bisher nicht möglich ist.

Im folgenden ist mit dem Begriff “Struktur” stets die Raumstruktur gemeint.

II.2 Methoden der Strukturaufklärung

Um die relative Anordnung von Gruppen bzw. Atomen im Raum zu erhalten, besteht die Möglichkeit,

- a.) ihre Position bezüglich eines äußeren Koordinatensystems zu ermitteln, oder
- b.) sich auf ein internes Koordinatensystem in Form von Abständen und Winkel zwischen den Gruppen zu beziehen.

Methode a.) führt direkt zu einem konkreten Modell des Moleküls und ähnelt so dem Vorgang des “Sehens”. Damit liegt sie der menschlichen Erfahrung wesentlich näher als Methode b.), bei der aus den Meßwerten erst ein räumliches Modell konstruiert werden muß, das dann auch wieder über das Sehen analysiert wird.

Die beiden Prinzipien finden sich in zwei Techniken der Strukturaufklärung wieder. Bei der *Röntgenstrukturanalyse* werden Atomkoordinaten in einem äußeren Koordinatensystem bestimmt, indem die Wechselwirkung zwischen den Atomen und Röntgenlicht detektiert wird. Die Grundlagen dieser Technik werden in den folgenden Abschnitten aufgezeigt.

Die zweite Methode bildet die Basis für die Strukturaufklärung mit Hilfe der *NMR-Spektroskopie*. Abstände können aus der Größe des “Kern-Overhauser-Effekts” und Winkel aus Kopplungskonstanten berechnet werden. Allerdings sind beide Phänomene nur über kurze Entfernungen zu beobachten, so daß eine Distanzenmatrix für das Protein hochgradig unvollständig bleibt. Zur Berechnung der Gesamtstruktur müssen daher viele Parameter theoretisch modelliert werden und beruhen somit nicht auf experimentellen Daten. Da die Bindungslängen und Winkel in einem Protein jedoch immer in der Nähe von Standardwerten liegen werden, sind ein Großteil der Abstandsparameter miteinander korreliert, so daß auch mit der NMR-Spektroskopie Raumstrukturen eindeutig aufgeklärt werden können.

II.3 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse:

Streuung, Interferenz, Beugung, Auflösung

Proteine sind globuläre Moleküle mit einem Durchmesser in der Größenordnung von 10 nm. Derartig kleine Objekte sind mit dem bloßen Auge nicht sichtbar, sondern müssen mit einem vergrößernden optischen Instrument betrachtet werden. Ein solches Instrument, z.B. eine Linse, sammelt das vom Objekt gestreute Licht und setzt daraus ein virtuelles Bild zusammen.

Im vergrößerten Abbild eines Proteinmoleküls müssen miteinander verbundene Atome getrennt sichtbar sein, um Abstände zwischen ihnen hinreichend genau bestimmen zu können. Damit kommen drei Bestandteile in Betracht, die die Leistungsfähigkeit einer derartigen Versuchsanordnung begrenzen können: das zur Bestrahlung des betrachteten Objektes verwendete Licht, das lichtsammelnde optische Instrument und der Detektor, mit dem das Licht aufgefangen wird. Die Ausbreitung von Licht läßt sich mit Wellenfunktionen beschreiben. Nach dem Huygen'schen Prinzip bildet jeder von einer Wellenfront erfaßte Punkt wieder den Ursprung für eine neue Kugelwelle. Solange das Medium, in dem sich die Welle ausbreitet, homogen ist, überlagern sich die Kugelwellen zu einer Wellenfront, die mit der erregenden Welle identisch ist. Wenn jedoch die Homogenität an einigen Stellen gestört ist, gehen von diesen Positionen Kugelwellen aus, die nicht mehr mit der Front laufen. Da diese Kugelwellen durch die gleiche Erregungswelle erzeugt worden sind, besteht zwischen ihnen eine feste Phasenbeziehung, und ein Interferenzmuster entsteht. Dieses zeigt ein Maximum, wenn der Wegunterschied des von zwei punktförmigen Störstellen ausgehenden Lichts ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge beträgt. Nur in diesem Fall überlagert sich das gestreute Licht konstruktiv.

Das Auftreten eines Beugungsmaximums ist also der Hinweis darauf, daß zwei Gegenstände (oder ein einzelner Gegenstand mit entsprechender Ausdehnung) den Weg des Lichts gesäumt haben. Damit wird das Auflösungsvermögen durch die Grenzbedingungen, bei denen noch ein Beugungsmaximum wahrnehmbar ist, bestimmt. Eine vereinfachte Ableitung ist in Abb. II.2 gezeigt:

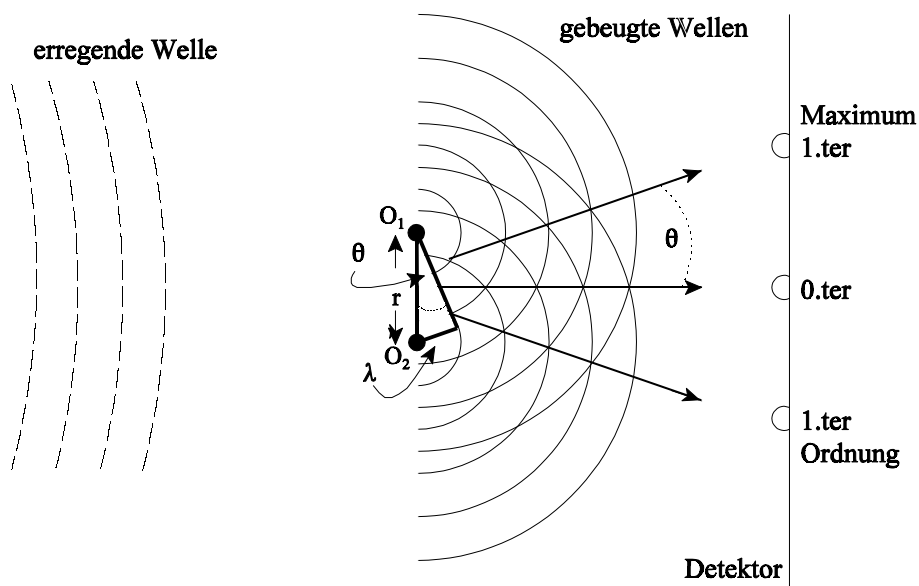


Abb. II.2: Zur Ableitung der maximalen Auflösung. Der Gangunterschied der von O_1 und O_2 ausgehenden Wellen beträgt am Beugungsmaximum 1.ter Ordnung genau 1λ .

Die Lichtwelle wird an den Punkten O_1 und O_2 gestreut. Zur Vereinfachung betrage der Winkel zwischen der Verbindungslinie von O_1 zu O_2 und der Einfallrichtung der Welle 90° , so daß beide Streuer gleichzeitig getroffen werden und vor der Streuung noch kein Gangunterschied zwischen den Kugelwellen der Wellenfront besteht. Dann gilt für die n.te konstruktive Interferenzen nach dem Streuvorgang:

$$\sin \theta = \frac{n \cdot \lambda}{r} \quad (\text{II.1})$$

Mit abnehmendem Abstand r zwischen den Streuern wächst der Beugungswinkel zum ersten Maximum immer weiter an.

Wird die oben gemachte Beschränkung bzgl. der Bestrahlungsrichtung in dem Sinne gelockert, daß das Licht auch schräg auf die Objekte fallen kann, so teilt sich der Gangunterschied zwischen die Strecke “vor” und “nach” den Objekten auf. Die Welle kann dann durch Verkürzung der Distanz zwischen O_1 und O_2 so stark gebeugt werden, daß das Maximum erster Ordnung mit der Ursprung der erregenden Welle zusammenfällt. In diesem Grenzfall gilt:

$$\sin \theta_{\max} = \frac{\lambda}{2} \cdot \frac{1}{r_{\min}} = 1 \quad (\text{II.2})$$
$$\Leftrightarrow r_{\min} = \frac{\lambda}{2}$$

Das Auflösungsvermögen ist also auf die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichtes beschränkt. Für die Aufklärung von Molekülstrukturen muß daher Licht mit einer Wellenlänge von etwa ein bis zwei Ångström (Röntgenlicht) verwendet werden, wenn einzelne Atome getrennt sichtbar sein sollen.

Hieraus ergeben sich folgende Konsequenzen:

- 1.) Röntgenlicht ist für das menschliche Auge unsichtbar, so daß das vergrößerte Objekt nicht direkt betrachtet werden kann, sondern ein Röntgenlichtdetektor verwendet werden muß.
- 2.) Der Brechungsindex von Röntgenlicht mit allen bekannten lichtdurchlässigen Materialien liegt nahe 1. Aus diesem Grund kann das gebeugte Licht nicht mit einer Linse zum virtuellen Abbild des betrachteten Gegenstandes zusammengesetzt werden. Die

Funktion der Linse wird deshalb mit anderen Mitteln simuliert. Da ein Beugungsbild aber berechnet werden kann, ist es in der Umkehrung auch möglich, die Gestalt des für die Beugung verantwortlichen Objektes zu bestimmen, indem das Beugungsbild vollständig aufgezeichnet wird.

- 3.) Die Wechselwirkung von Röntgenstrahlen mit Materie ist gering, und nur ein kleiner Teil des einfallenden Röntgenstrahls wird gebeugt. Außerdem muß die Messung des Beugungsbildes zur Erzielung einer Vergrößerung in einiger Entfernung vom beugenden Gegenstand erfolgen. Wenn die Distanz zwischen Detektor und Molekül etwa 10 cm beträgt, so hat sich bei einem Moleküldurchmesser von 10 nm die vom Licht bestrahlte Fläche bei der Detektion gegenüber der Moleküloberfläche etwa $4 \cdot 10^{12}$ -fach vergrößert, und das Signal ist entsprechend abgeschwächt. Da die heutzutage verwendeten Röntgenlichtdetektoren nicht die nötige Empfindlichkeit aufweisen, muß das Signal über einen sehr langen Zeitraum aufaddiert werden. Für die Dauer der Detektion darf sich das Molekül bzgl. des Detektors nur innerhalb der Auflösungsgrenzen bewegen. Dafür müßte ein Proteinmolekül zusammen mit seinem Lösungsmittel beispielsweise auf einer Oberfläche unter extremer Kühlung fixiert werden, denn seine thermischen Bewegungen in Lösung lassen eine derartige Messung nicht zu. Das Problem der Signalstärke läßt sich überwinden, indem das überlagerte Beugungsbild sehr vieler gleichartiger Moleküle zur selben Zeit registriert wird. Um ein solches Experiment auswerten zu können, muß jedoch die relative Anordnung der Objekte zueinander bekannt sein. In der Praxis ist dies nur zu verwirklichen, wenn die Anordnung regelmäßig ist, die Objekte sich also zu einem "Kristall" zusammengelagert haben. Da ein Kristall ein handhabbarer Gegenstand ist, wird so gleichzeitig die Fixierungsfrage gelöst.

II.4 Kristalle

II.4.a Eigenschaften von Proteinkristallen

Kristalle sind aus aneinandergelegten identischen Bausteinen, den sog. Elementarzellen, aufgebaute Körper. Jeder dieser Bausteine kann mehrere gleichartige "asymmetrische Einheiten" enthalten, die sich geometrisch durch Symmetrieelemente wie Drehachse, Spiegelebene, Schraubenachse etc. zur Deckung bringen lassen. Ein Kristall zeichnet sich dadurch aus, daß die in der Elementarzelle existierenden Symmetrieeoperationen auch für den gesamten Kristall gelten. Die Anzahl der Anordnungsmöglichkeiten (Raumgruppen), die zu einem Kristall führen, ist dabei relativ begrenzt. Dies gilt im besonderen für Proteinmoleküle, da die chiralen Zentren der Aminosäuren keine Symmetrieelemente im Kristall zulassen, die mit einer Umkehrung der

Chiralität verknüpft sind. Von den 230 theoretisch möglichen Raumgruppen können Proteine somit nur in 65 kristallisieren.

Im Kristall berühren sich die Oberflächen der Proteinmoleküle mit bestimmten Vorzugsorientierungen. An den Kontaktstellen wirken Anziehungskräfte, so daß bei der Aneinanderlagerung der Moleküle Wärme frei wird. Nur in einem Kristall können diese attraktiven Wechselwirkungen für alle Moleküle optimal realisiert werden. Außerdem ist noch ein positiver Entropiebeitrag bei der Kristallisation zu berücksichtigen, denn bei der Aneinanderlagerung treten Wassermoleküle, die vorher an der Proteinoberfläche über Wasserstoffbrücken bzw. in hydrophoben Bereichen als Clathratstrukturen fixiert waren (Teeter, 1989), in das Lösungsmittel über. Der mit der Mutterlauge in Kontakt stehende Kristall stellt also das thermodynamisch günstigste fest/flüssig-System dar.

Die Faltung eines Proteins bleibt bei der Kristallisation erhalten, was im hohen Lösungsmittelgehalt der Kristalle begründet ist, der bei etwa 50 Vol.-% liegt. Als Beispiel sei eine würfelförmige Elementarzelle gegeben, an deren Ecken sich jeweils ein kugelförmiges Molekül befindet. Diese Moleküle berühren sich an der halben Kantenlänge. Da jede Kugel zu acht benachbarten Elementarzellen gehört, gilt für das Verhältnis von Gesamtvolumen der Elementarzelle zum besetzten Volumen:

$$\frac{V_{W, ges.}}{V_{W, occ.}} = \frac{(2r)^3}{\frac{4}{3}\pi r^3} = \frac{6}{\pi} \approx 2 \quad (\text{II.3})$$

Der exakte Wert ist von der konkreten Form des Proteins und der Geometrie der Elementarzelle abhängig.

Durch das ungeordnete und nicht besonders stark fixierte Lösungsmittel sind Proteinkristalle sehr weich und trocknen leicht aus. Außerdem erlaubt die Größe der Lösungsmittelkanäle die Diffusion kleiner Moleküle im Kristall, so daß z.B. Substrate nachträglich an das untersuchte Protein angelagert werden können.

II.4.b Herstellung von Proteinkristallen

Die Kristallisationsvorgang ist noch nicht in allen Einzelheiten erforscht. Sicher ist, daß zunächst sog. Kristallisationskeime entstehen müssen, die erst auftreten, wenn die Proteinlösung stark übersättigt ist. Die Übersättigung führt wahrscheinlich zu einem flüssig/flüssig-System mit einer schwach und einer stark konzentrierten Flüssigphase (Wolde & Frenkel, 1997), aus der dann die Kristalle herauswachsen.

Da die attraktiven Wechselwirkungen in Proteinkristallen bezogen auf die Größe der Moleküle

ziemlich schwach sind und bei schwereren Körpern außerdem davon ausgegangen werden kann, daß die Ausrichtung aufgrund der größeren Trägheit mehr Zeit in Anspruch nimmt, ist es wichtig, daß die zur Kristallisation führende Lösungsübersättigung nicht zu schnell erfolgt, denn sonst kommt es zu einer amorphen Präzipitation. In der Praxis wird deshalb das gelöste Protein langsam bis über die Fällungsgrenze aufkonzentriert, indem ihm das solvatisierende Wasser durch Diffusion entzogen wird. Der Experimentator kann das System beeinflussen, indem er über den pH-Wert die Oberflächeneigenschaften des Proteins verändert, die Temperatur gemäß dem Löslichkeitsverhalten variiert, und die Methode sowie den Endpunkt der Aufkonzentrierung wählt.

Für die Kristallisation muß das gelöste Protein in hochreiner und bzgl. der Faltung homogener Form vorliegen. Außerdem sollte die Konzentration bei einigen mg/ml liegen, denn sonst können die für die Kristallisation nötige Übersättigung nicht erreicht und die für das Kristallwachstum erforderlichen Transportprozesse nicht aufrechterhalten werden. Falls alle Kristallisationsversuche scheitern, müssen daher umfangreiche analytische Experimente zur Eingrenzung des Problems durchgeführt werden.

II.5 Das Beugungsbild von Kristallen

Wenn elektromagnetische Strahlung auf geladene Teilchen trifft, regt sie diese zu Schwingungen derselben Wellenlänge an. Nach J.J. Thomson ist die Intensität dieser Streustrahlung umgekehrt proportional zum Quadrat der Masse des angeregten Teilchens. Hieraus folgt, daß in der Molekülstrukturanalyse mit Röntgenlicht die Elektronen den wesentlichen Beitrag zum Beugungsbild liefern, da ihr Gewicht nur etwa 1/1800 dessen von Protonen beträgt.

Das Beugungsbild des gesamten Kristalls resultiert aus der Überlagerung der von jedem Elektron ausgehenden Streuwellen. Die Überlagerung von Wellen läßt sich mathematisch durch Addition der Wellengleichungen, die sich als Exponentialfunktionen schreiben lassen, wiedergeben:

$$E_{ges} = \sum_j E_j \cdot e^{i\alpha_j} \quad (\text{II.4})$$

Entscheidend bei der Addition ist, daß für jede Welle E_j eine Phasendifferenz α_j zu berücksichtigen ist, die sich aus der auf einen gemeinsamen Ursprung bezogenen Streuerposition ergibt. Ein Ausdruck für die Phasendifferenz läßt sich mit Hilfe der Vektorrechnung aus der Betrachtung zweier streuender Elektronen ableiten (Abb. II.3).

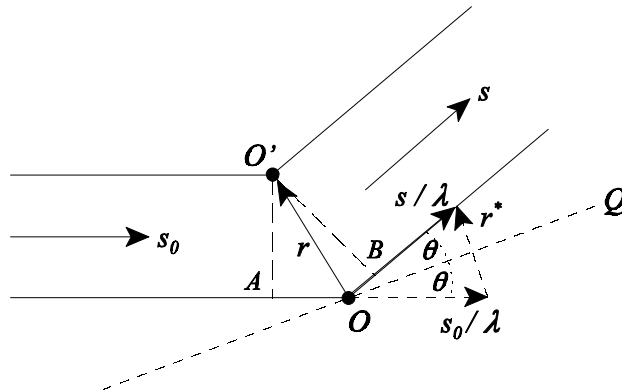


Abb. II.3: Zwei Streuer an O und O'. $AO = -\mathbf{r} \cdot \mathbf{s}_0$, $BO = \mathbf{r} \cdot \mathbf{s}$.

Das einfallende Licht sei durch den Einheitsvektor \mathbf{s}_0 beschrieben. Zwei Elektronen an den Positionen O und O' säumen den Weg der Welle und streuen das Licht in alle Raumrichtungen. Für einen Beobachter, der das System entgegen der Richtung von \mathbf{s} betrachtet, besitzen die beiden Streuwellen einen Phasenunterschied α (Glg. II.5):

$$\alpha = \frac{2\pi}{\lambda} (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0) \cdot \mathbf{r} = 2\pi \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r} \quad (\text{II.5})$$

mit $\mathbf{r}^* = \frac{\mathbf{s} - \mathbf{s}_0}{\lambda}$

Der "Streuvektor" \mathbf{r}^* beschreibt die Ablenkung von \mathbf{s}_0 in Richtung von \mathbf{s} . Alternativ kann \mathbf{s} auch als eine Welle, die an der zu \mathbf{r}^* senkrecht stehenden Linie OQ reflektierte wurde, angesehen werden. Diese Linie schließt mit der Richtung der einfallenden Strahlung den Winkel θ ein. In \mathbf{r}^* ist somit die Richtungsabhängigkeit der Beobachtung enthalten.

Mit dem in Gleichung II.5 gegebenen Ausdruck für die Phasendifferenz kann für die Amplitude $f(\mathbf{r}^*)$ eines aus N Einheitspunktstreuern bestehenden Objektes geschrieben werden:

$$f(\mathbf{r}^*) = \sum_{j=1}^N A_j \cdot e^{2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r}_j} \quad (\text{II.6})$$

A_j ist die Amplitude der an j gestreuten Welle, und \mathbf{r}_j ist der Ortsvektor von j bezogen auf einen gemeinsamen Ursprungs des Systems.

Wenn das streuende Objekt nicht aus diskreten Streuern besteht, sondern vielmehr ein streuendes Kontinuum darstellt, so ist die Amplitude zur "Streudichte" $\rho(\mathbf{r})$ des entsprechenden Volumenelementes $d\mathbf{r}$ proportional, und die Summe aus Glg. II.6 geht in ein Integral über den streuenden Raum V über. Für die Elektronenhülle eines Atoms wird

$$f(\mathbf{r}^*) = \int_V \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r} \quad (\text{II.7})$$

als atomarer Streufaktor bezeichnet, wobei die Amplitude auf den Wert 1 normiert ist. Glg. II.7 gibt die Amplitude des Streulichts in Abhängigkeit von \mathbf{r}^* und damit vom Beugungswinkel an. Die durch das Integral beschriebene Funktion ist eine "Fouriertransformation". Sie stellt das mathematische Bindeglied zwischen Beugungsbild und streuendem Objekt dar, denn in der Umkehrung der Gleichung läßt sich schreiben:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_{V^*} f(\mathbf{r}^*) e^{-2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r}^* \quad (\text{II.8})$$

Somit kann aus dem Beugungsbild die Gestalt des Objekts in Form seiner streuenden Dichte rekonstruiert werden.

Ist der betrachtete Gegenstand ein Molekül, so überlagert sich die von den einzelnen Atomen j gestreute Strahlung, und die Fouriertransformation lautet:

$$F_M(\mathbf{r}^*) = \sum_{j=1}^N f_j(\mathbf{r}^*) e^{2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r}_j} \quad (\text{II.9})$$

Der gleiche Ausdruck kann auch zur Beschreibung des Beugungsbildes einer Elementarzelle im Kristall verwendet werden, da es keine Rolle spielt, ob die Atome durch chemische Bindungen miteinander verknüpft sind oder nicht.

Die Gesamtstreuung eines Kristalls ergibt sich aus der Überlagerung der Funktionen für die einzelnen Elementarzellen. Da diese durch Translation mit ganzzahligen Vielfachen t , u und v der Gittervektoren \mathbf{a} , \mathbf{b} und \mathbf{c} ineinander überführt werden können, gibt die Gleichung

$$F_K(\mathbf{r}^*) = F_M(\mathbf{r}^*) \cdot \sum_{t=0}^{N(t)} e^{t \cdot (2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{a})} \cdot \sum_{u=0}^{N(u)} e^{u \cdot (2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{b})} \cdot \sum_{v=0}^{N(v)} e^{v \cdot (2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{c})} \quad (\text{II.10})$$

einen Ausdruck für das Beugungsbild eines Kristalls, wenn für alle Elementarzellen ein gemeinsamer Ursprung eingeführt wird, so daß t , u und v eine Art Index für jede Zelle darstellen.

Die Funktion in Glg. II.10 besitzt eine interessante Eigenschaft. Bei einem Kristall mit einem Volumen von etwa 1 mm^3 und einer Elementarzellenkantenlänge von 100 Å beträgt der Wert von $N(t)$, $N(u)$ bzw. $N(v)$ ungefähr 10^4 . Bei so großen Zahlen ist $F_K(\mathbf{r}^*)$ nur dann von Null verschieden, wenn das Skalarprodukt aus Streuvektor \mathbf{r}^* und Gittervektor \mathbf{a} , \mathbf{b} oder \mathbf{c} gleichzeitig in allen drei Summentermen einen ganzzahligen Wert annimmt (Laue-Bedingung). In diesem Falle entsprechen die Exponenten in den Summen einem Mehrfachen von 2π , so daß die Beugungsbilder der einzelnen Elementarzellen in diesen Richtungen von \mathbf{r}^* alle die gleiche Phase besitzen und sich gegenseitig verstärken. Im Gegensatz dazu existiert bei Nichterfüllung dieser Bedingung zu jeder Indexkombination (t_a, u_a, v_a) eine Indexkombination (t_b, u_b, v_b) , die zur gegenseitigen Auslöschung der Wellen führt. Das Beugungsbild eines Kristalls muß demnach aus scharf abgegrenzten Bereichen mit hoher Röntgenlichtintensität, den sog. Reflexen, bestehen, dem andere Regionen, in denen kein gebeugtes Licht beobachtet werden kann, gegenüberstehen. Die Reflexe lassen sich durch ganzzahlige Indizes h , k und l

$$\begin{aligned}\mathbf{r}^* \cdot \mathbf{a} &= h \\ \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{b} &= k \\ \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{c} &= l\end{aligned}\tag{II.11}$$

eindeutig benennen.

Damit kann ein Zusammenhang zwischen dem Inhalt der Elementarzelle eines Kristalls $\rho(\mathbf{r})$ und seinem Beugungsbild angegeben werden. Jede Position in der Elementarzelle sei durch fraktionelle Koordinaten x , y und z mit $0 \leq x; y; z \leq 1$ bestimmt. Für das Skalarprodukt aus Orts- und Streuvektor gilt dann:

$$\begin{aligned}\mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r} &= \mathbf{r}^* \cdot (\mathbf{a}x + \mathbf{b}y + \mathbf{c}z) \\ &= \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{a}x + \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{b}y + \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{c}z \\ &= hx + ky + lz\end{aligned}\tag{II.12}$$

$F_K(\mathbf{r}^*)$ kann demnach auch als $F_K(h k l)$ geschrieben werden. Die Fouriertransformation eines Kristalls, der aus Elementarzellen mit dem Inhalt $\rho(x y z)$ und dem Volumen V zusammengesetzt ist, lautet somit:

$$F_K(h\ k\ l) = V \iiint_{x\ y\ z} \rho(x\ y\ z) e^{2\pi i (hx + ky + lz)} dx dy dz \quad (\text{II.13})$$

In der Umkehrung berechnet sich die streuende Dichte in der Elementarzelle mit der Gleichung:

$$\rho(x\ y\ z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_K(h\ k\ l) e^{-2\pi i (hx + ky + lz)} \quad (\text{II.14})$$

Die Integration wird hier durch Summen ersetzt, weil nur an diskreten Stellen gestreutes Licht zu beobachten ist und der Zwischenraum zwischen den Reflexen unberücksichtigt bleiben kann.

II.6 Die Bestimmung von $F_K(h\ k\ l)$

Die “Strukturfaktoren” $F_K(h\ k\ l)$ sind komplexe Zahlen. Für ihre Bestimmung müssen sowohl ein Betrag als auch eine Phase angegeben werden:

$$F_K(h\ k\ l) = |F_K(h\ k\ l)| \cdot e^{i\alpha(hkl)} \quad (\text{II.15})$$

Da für Röntgenlicht keine kohärenten Strahlungsquellen existieren, ist es derzeit allerdings nur möglich, die Strukturfaktoramplitude $|F_K(h\ k\ l)|$ zu ermitteln. Die zugehörigen Phasen $\alpha(h\ k\ l)$ können lediglich indirekt bestimmt werden (s. Kapitel II.8.a. und II.8.b).

Die Aufzeichnung der Reflexe kann wegen der heutigen Auswertungscomputerprogramme relativ unsystematisch erfolgen. Der Kristall wird hierzu ohne vorherige Ausrichtung seiner Zellachsen um eine Achse senkrecht zum Röntgenstrahl gedreht und das gestreute Licht kontinuierlich auf einzelnen Bilder für relativ kleine Rotationswinkel (typischerweise 1°) gesammelt (vgl. Abb. II.4). Da der Schwenkbereich während einer einzelnen Aufnahme mehrfach durchschritten werden kann, wird diese Meßvariante “Rotations-” bzw. “Oszillationsmethode” genannt.

Die Intensität eines Reflexes wird z.B. anhand der Schwärzung des Films bestimmt. Anschließend werden hieraus die $|F_K(h\ k\ l)|$ berechnet, denn $I(h\ k\ l)$ steht mit der Strukturfaktoramplitude in einem proportionalen Zusammenhang:

$$I(h\ k\ l) = k \cdot |F_K(h\ k\ l)|^2 \quad (\text{II.16})$$

Die Proportionalitätskonstante k enthält neben den Abmessungen des Kristalls und der Elementarzelle sowie der Intensität des einfallenden Röntgenstrahls auch noch verschiedene Korrekturfaktoren für Absorption und Polarisierung.

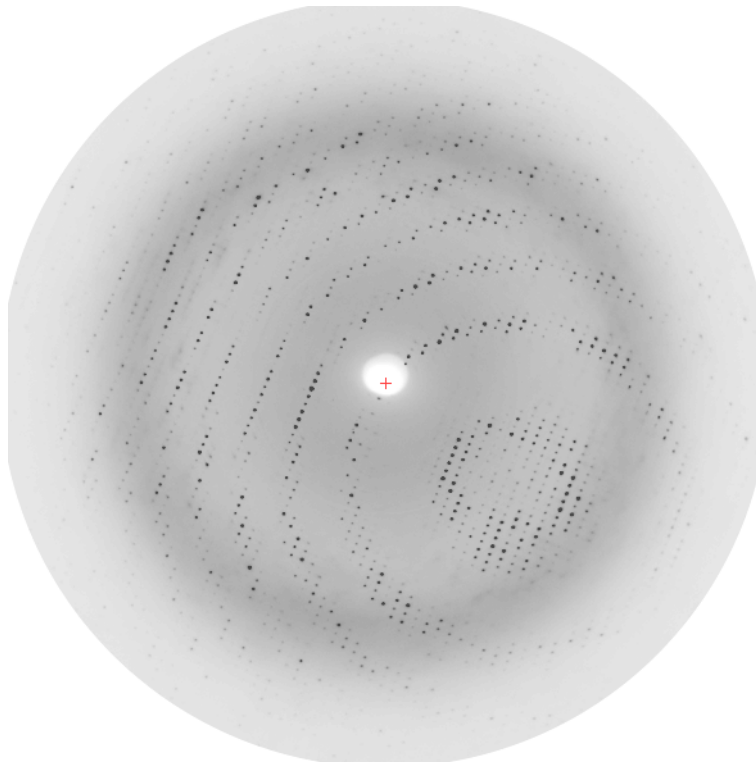


Abb. II.4: 1°-Oszillationsaufnahme eines *T. cruzi*-TAT-Kristalls. Der Bildmittelpunkt ist durch ein Kreuz gekennzeichnet.

II.7 Der Informationsgehalt von $|F_K(h\ k\ l)|$

II.7.a Raumgruppenbestimmung, Matthews-Parameter, Mosaizität

Die Struktur eines Proteins kann aufgrund der fehlenden Phaseninformation zwar nicht allein aus der Gesamtheit der $|F_K(h\ k\ l)|$ bestimmt werden, dennoch enthält ein derartiger “Datensatz” Informationen, die für die Aufklärung einer Kristallstruktur essentiell sind.

Zunächst lassen sich über die Abstände und Winkel zwischen den Reflexen die Abmessungen der Einheitszelle bestimmen. Aus dem systematischen Auftreten von Auslöschungen und aus der Symmetrie des Beugungsbildes kann die Raumgruppe des Kristalls eingegrenzt werden. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes des untersuchten Proteins wird dann der sog. Matthews-Parameter V_M in $\text{\AA}^3/\text{Da}$, ein Maß für die Dichte der Kristallpackung, berechnet

(Matthews, 1968). Da dieser Wert bei Proteinkristallen in der Regel zwischen 1.7 und 3.5 Å³/Da liegt, läßt sich hiermit die Richtigkeit der Raumgruppenbestimmung überprüfen.

Proteinkristalle sind niemals perfekt, sondern bestehen aus kleineren Blöcken mit hoher Packungsqualität. Für diese Blöcke ist die Bedingung, aus einer unendlichen Zahl von Elementarzellen zu bestehen, nicht mehr ausreichend erfüllt. Außerdem sind die Blöcke leicht gegeneinander verschwenkt. Aus diesen Gründen besitzen die gemessenen Reflexe oft eine so große Breite, daß sie sich nicht vollständig auf einem Oszillationsbild beobachten lassen und über mehrere Aufnahmen aufaddiert werden müssen. Aus der Breite der Reflexe können Schlüsse über die Güte des untersuchten Kristalls gezogen und die "Mosaizität", ein Maß für die mittlere Verschwenkung, bestimmt werden

II.7.b Auflösung, Mittlerer Temperaturfaktor, Standardabweichung

Die Intensität der Reflexe nimmt mit zunehmendem Abstand von der Bildmitte ab (s. Abb. II.4), bis schließlich kein gestreutes Röntgenlicht mehr sichtbar ist. Dieser Beugungsrand bestimmt das Auflösungsvermögen des untersuchten Kristalls und läßt Rückschlüsse über das kleinste noch erkennbare Detail in der Elektronendichte und somit über die Aussagekraft des aus der Messung zu konstruierenden Strukturmodells zu.

Aus dem Abfallen der Intensität mit zunehmender Auflösung der Röntgenreflexe kann ein mittlerer "Temperaturfaktor" B berechnet werden. Die Atome eines Moleküls stehen während der Messung nicht still, sondern schwingen mehr oder weniger stark um eine Ruhelage. Dies ist zum einen in der thermischen Vibration der einzelnen Atome, zum anderen aber auch in der konzertierten Bewegung ganzer Molekülbereiche, z.B. nicht durch Kristallkontakte fixierter "Domänen", begründet. Auch Fehlordnung im Kristall leistet einen Beitrag. Die Folge ist, daß die atomaren Streufaktoren f^0 mit einem Faktor korrigiert werden müssen. Diese Korrektur hat für das i -te Atom die Form:

$$f_i(\mathbf{r}^*)^2 = f_i^0(\mathbf{r}^*)^2 \cdot e^{-2B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}} \quad (\text{II.17})$$

Da die Intensität I aus der Zahl der Elektronen auf einer absoluten Skala berechnet werden kann, besteht die Möglichkeit, über ihren Mittelwert

$$\overline{I_{abs}(\mathbf{r}^*)} = \overline{|\mathbf{F}(\mathbf{r}^*)|^2} = \sum_i f_i(\mathbf{r}^*)^2 \quad (\text{II.18})$$

aus der mittleren beobachteten Intensität den mittleren Temperaturfaktor der Atome zu bestimmen.

Zwischen gemessener und absoluter Intensität bestehe ein Quotient C , so daß sich daraus ergibt:

$$\overline{I_{obs}(\mathbf{r}^*)} = C \cdot \overline{I_{abs}(\mathbf{r}^*)} = C \cdot e^{-2B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}} \cdot \sum_i f_i^0(\mathbf{r}^*)^2 \quad (\text{II.19})$$

$$\Rightarrow \ln \frac{\overline{I_{obs}(\mathbf{r}^*)}}{\sum_i f_i^0(\mathbf{r}^*)^2} = \ln C - 2B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}$$

Mit der Umformung zu einer Geraden in Glg. II.19 kann B durch Auftragung gegen $\sin^2 \theta / \lambda^2$ aus der Steigung bestimmt werden (Wilson-Plot; Wilson, 1942). Es eröffnet sich dann die Möglichkeit, aus den beobachteten Intensitäten Strukturfaktoramplituden auf einer absoluten Skala zu berechnen.

Häufig schwingen die Atome nicht gleich stark in alle drei Raumrichtungen, da ein Kristall für das einzelne Molekül und ein Molekül für das einzelne Atom eine stark anisotrope Umgebung darstellt. Diese Anisotropie kann bei der Skalierung von beobachteten und berechneten Strukturfaktoren (Verwendung letzterer s. II.8 und II.9) und bei der Berechnung von $|F_K(\mathbf{h} \mathbf{k} \mathbf{l})|$ aus I_{obs} berücksichtigt werden.

Neben den Amplituden wird im Datensatz für jeden Reflex außerdem eine Standardabweichung $\sigma(\mathbf{h} \mathbf{k} \mathbf{l})$ angegeben. Diese wird nach einem statistischen Verfahren aus den Meßwerten von mehrfach aufgenommenen Reflexen berechnet, wobei eine lineare Abhängigkeit von der mittleren Intensität einer Mehrfachmessung angenommen wird (French & Wilson, 1978). Die $\sigma(\mathbf{h} \mathbf{k} \mathbf{l})$ geben ein Maß für die Zuverlässigkeit der dazugehörenden Amplitude an und können daher in späteren Rechnungen als Gewichtungsfaktoren verwendet werden (s. Kapitel II.9).

II.7.c Pattersonfunktion, Selbstrotation

Proteine sind häufig aus mehreren identischen Untereinheiten aufgebaut. Die Symmetrieelemente, die diese Untereinheiten aufeinander abbilden, müssen nicht mit den Symmetrieelementen der Elementarzelle zusammenfallen, so daß die asymmetrische Einheit des Kristalls mehrere gleichartige Molekülkopien enthalten kann. In diesem Falle wird von Nichtkristallografischer Symmetrie gesprochen. Die Lage nichtkristallografischer Rotationsachsen relativ zu den Kanten der Elementarzelle läßt sich bereits aus dem $|F_K(\mathbf{h} \mathbf{k} \mathbf{l})|$ -Datensatz bestimmen. Dafür muß aus den Strukturfaktoramplituden nach

$$\begin{aligned}
 P(\mathbf{u}) &= \int_{r_1} \rho(\mathbf{r}_1) \cdot \rho(\mathbf{r}_1 + \mathbf{u}) d\mathbf{v} \\
 &= \frac{1}{V} \sum_{hkl} |\mathbf{F}_K(h\ k\ l)|^2 \cos(2\pi(hu + kv + lw))
 \end{aligned}
 \tag{II.20}$$

eine sog. Pattersonfunktion $P(u\ v\ w)$ berechnet werden.

Glg. II.20 ähnelt der Fouriertransformation in Glg. II.14, wobei allerdings keine komplexen Zahlen und damit auch keine Phasen mehr enthalten sind. u , v und w geben Koordinaten in einer "Pattersonzelle" an, die in ihren Abmessungen der Elementarzelle des Kristalls entspricht, jedoch einen Inhalt $P(u\ v\ w)$ mit anderen Eigenschaften aufweist. $P(u\ v\ w)$ besitzt immer dann ein Maximum, wenn das Koordinatentriplett $\mathbf{u} = (u\ v\ w)$ dem Vektor zwischen zwei Atomen entspricht. Somit enthält die Pattersonzelle die Gesamtheit aller interatomaren Vektoren, die in der Elementarzelle des untersuchten Kristalls existieren, ohne eine Information über ihren Ursprung, also die Koordinaten der einzelnen Atome, zu geben (Abb. II.5). Im $|\mathbf{F}_K(h\ k\ l)|$ -Datensatz ist folglich eine Abstandsstatistik enthalten.

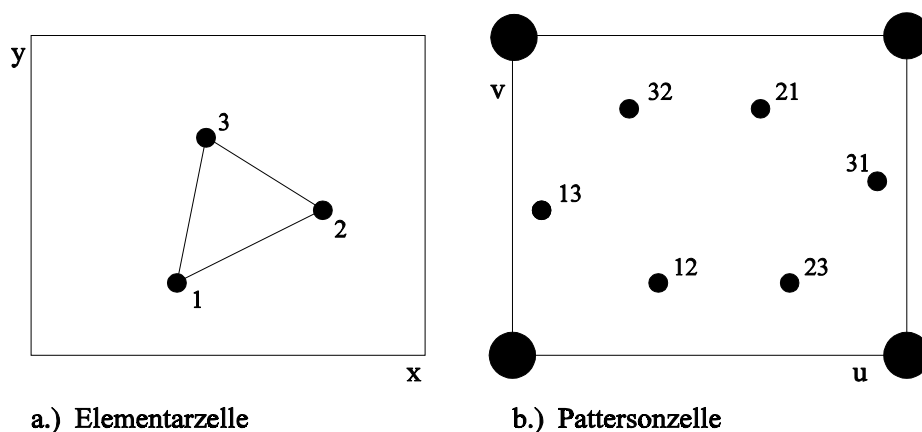


Abb. II.5: Beispiel für eine zweidimensionale Elementarzelle mit zugehöriger Pattersonzelle. Am Ursprung von b.) sammeln sich die Vektoren, die auf jedes Atom selbst zurückführen.

Bei kleineren Molekülen ist es möglich, die Struktur nur anhand der Pattersonfunktion zu rekonstruieren, denn die Gesamtheit aller Abbildungsvektoren liefert eine alternative Beschreibung der Raumstruktur (s. Kapitel II.2). Da die Anzahl der interatomaren Vektoren von N Atomen jedoch $N \cdot (N-1)$ beträgt (Ursprungsvektoren unberücksichtigt), wächst die Komplexität der Funktion mit zunehmendem N so stark an, daß diese Rekonstruktion bei größeren Molekülen nicht mehr gelingt.

Jedes Molekül in der asymmetrischen Einheit liefert einen Satz von Pattersonvektoren. Wenn hier mehrere identische Moleküle vorhanden sind, ähneln sich diese Sätze in den Längen und relativen Ausrichtungen der Vektoren, sind jedoch gegeneinander rotiert. Durch die Maximierung einer “Selbstrotationsfunktion” $R_{\text{self}}([C])$ läßt sich die zugehörige Rotationsmatrix $[C]$ ermitteln:

$$\begin{aligned}
 R_{\text{self}}([C]) &= \int_U P(\mathbf{u}) \cdot P([C]\mathbf{u}) \, d\mathbf{u} \\
 &= \frac{1}{V^2} \sum_{\mathbf{h}} \sum_{\mathbf{h}'} |F(\mathbf{h})|^2 \cdot |F(\mathbf{h}')|^2 \cdot \int_U e^{-2\pi i(\mathbf{h} + [C]^{-1}\mathbf{h}') \cdot \mathbf{u}} \, d\mathbf{u}
 \end{aligned}
 \tag{II.21}$$

Das durch $R_{\text{self}}([C])$ gegebene Faltungsintegral über das Volumen der Pattersonzelle U nimmt immer dann große Werte an, wenn sich die beiden Pattersonfunktionen mit möglichst ähnlichen Mustern überlagern.

II.8 Die Bestimmung der Phase von $F_K(\mathbf{h} \, \mathbf{k} \, \mathbf{l})$

II.8.a Molekularer Ersatz

Die Glg. II.13 und II.14 stellen einen Zusammenhang zwischen dem Inhalt der Elementarzelle $\rho(x \, y \, z)$ und dem Beugungsbild $F_K(\mathbf{h} \, \mathbf{k} \, \mathbf{l})$ her. Wenn die Struktur eines zum untersuchten Protein verwandten Moleküls bekannt ist, kann $|F_K(\mathbf{h} \, \mathbf{k} \, \mathbf{l})|$ durch korrekte Positionierung der bekannten Struktur bzgl. der Symmetrieelemente der Elementarzelle näherungsweise simuliert werden. Hieraus lassen sich Phasen $\alpha_{\text{calc}}(\mathbf{h} \, \mathbf{k} \, \mathbf{l})$ ableiten, die in Kombination mit den experimentellen Strukturfaktoramplituden zur Berechnung einer initialen Elektronendichte $\rho(x \, y \, z)$ verwendet werden können.

Für die Lokalisierung der Modellstruktur in einer Elementarzelle sind drei Rotations- und drei Translationsparameter zu bestimmen. Allerdings müssen nicht alle sechs Größen gleichzeitig ermittelt werden, sondern die Suche läßt sich in die Bestimmung der Winkel mit anschließender Berechnung der Position der rotierten Struktur aufteilen.

Rotationssuche

Die Ermittlung der Rotationsmatrix entspricht der Selbstrotation nach Glg. II.21, nur daß hier die Pattersonfunktion aus der Röntgenmessung mit einer theoretisch berechneten Pattersonfunktion der bekannten Struktur gefaltet wird. Damit diese von den intramolekularen Pattersonvektoren beherrscht und nicht durch Kristallpackungseffekte verfälscht wird, muß das bekannte Protein vor seiner Fouriertransformation (Glg. II.13) in einer hinreichend großen Elementarzelle

positioniert werden.

Translationssuche

Für die Translationssuche wird zunächst mit der korrekt rotierten Modellstruktur eine Pattersonfunktion konstruiert, die nur die intermolekularen Vektoren zwischen kristallografisch symmetrieäquivalenten Molekülen in der Elementarzelle enthält (Crowther & Blow, 1967).

$$P_{M1, M2}(\mathbf{u}, \mathbf{t}) = \int_V \rho_{M1}(\mathbf{r}) \cdot \rho_{M2}(\mathbf{r} + \mathbf{u}) d\mathbf{r} \quad (\text{II.22})$$

ρ_{M2} läßt sich unter Anwendung der kristallografischen Symmetrieeoperatoren aus ρ_{M1} erzeugen. Somit besitzt $P_{M1, M2}(\mathbf{u}, \mathbf{t})$ für jede Raumgruppe eine andere Gestalt. Die Funktion hängt vom gesuchten Translationsvektor \mathbf{t} ab, denn dieser bestimmt die Position der Moleküle relativ zu den Symmetrieelementen und damit deren Wirkung auf die Atomkoordinaten.

$P_{M1, M2}(\mathbf{u}, \mathbf{t})$ wird dann mit der Pattersonfunktion der Meßwerte $P_{\text{obs}}(\mathbf{u})$ in einem Faltungsintegral kombiniert:

$$T(\mathbf{t}) = \int_V P_{M1, M2}(\mathbf{u}, \mathbf{t}) \cdot P_{\text{obs}}(\mathbf{u}) d\mathbf{u} \quad (\text{II.23})$$

Da $P_{\text{obs}}(\mathbf{u})$ alle intermolekularen Vektoren enthält, weist die Translationsfunktion ein Maximum auf, wenn der Translationsvektor \mathbf{t} den korrekten Wert annimmt.

Lokale Maxima in $T(\mathbf{t})$ können sowohl nach dem “R-Wert”

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||\mathbf{F}_{\text{obs}}| - k \cdot |\mathbf{F}_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl} |\mathbf{F}_{\text{obs}}|} \quad (\text{II.24})$$

als auch nach dem mit Glg. II.25 zu berechnenden Korrelationskoeffizienten charakterisiert werden:

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|\mathbf{F}_{\text{obs}}|^2 - \overline{|\mathbf{F}_{\text{obs}}|^2}) \cdot (|\mathbf{F}_{\text{calc}}|^2 - \overline{|\mathbf{F}_{\text{calc}}|^2})}{\sqrt{\sum_{hkl} (|\mathbf{F}_{\text{obs}}|^2 - \overline{|\mathbf{F}_{\text{obs}}|^2})^2 \cdot \sum_{hkl} (|\mathbf{F}_{\text{calc}}|^2 - \overline{|\mathbf{F}_{\text{calc}}|^2})^2}} \quad (\text{II.25})$$

Der Vorteil der Verwendung des Korrelationskoeffizienten besteht darin, daß er nicht von einem Skalierungsfaktor k abhängig ist und außerdem eine geringere Empfindlichkeit sowohl der Korrektheit von Rotations- und Translationsparametern als auch den Meßwerten gegenüber aufweist. Es ist daher weniger wahrscheinlich, daß die korrekte Lösung für den Molekularen Ersatz unentdeckt bleibt.

Der Translationsvektor kann auch mit einer Trial-and-Error-Methode ermittelt werden. Die nach den Maxima der Rotationsfunktion orientierte Modellstruktur wird hierzu durch die aus dem Experiment bestimmte Elementarzelle geschoben. An jeder Position wird dann ihr Beugungsbild berechnet und mit den gemessenen $|F_K(h\ k\ l)|$ -Werten nach den Glg. II.24 bzw. II.25 verglichen. Allerdings ist diese Methode mit einem wesentlich größeren Rechenaufwand verbunden.

Die Erfolgchancen eines Molekularen Ersatzes hängen von der Faltungsähnlichkeit zwischen neuer und bekannter Struktur ab. Im allgemeinen wird angenommen, daß bereits eine Sequenzidentität von 30% zur gleichen Faltung führt, wobei dieser Wert aber keineswegs limitierend ist. Insbesondere "alte" Proteinfamilien wie z.B. die Aminotransferasen weisen bei wesentlich geringerer Sequenzverwandschaft immer noch sehr ähnliche Topologien auf.

Wenn Rotations- und Translationsfunktion keine eindeutige Vorzugsorientierung liefern, müssen Zusatzinformationen, wie die Selbstrotationsfunktion des gemessenen Datensatzes oder die Kristallpackungsanalyse der berechneten Orientierungen, verwendet werden.

II.8.b Schweratommethode - Isomorpher Ersatz

Die Strukturfaktoren F_K entstehen aus der Überlagerung von Streuwellen, die von den einzelnen Atomen in der Elementarzelle ausgehen. Die Gesamtstruktur $\rho(x\ y\ z)$ kann somit auch als Zusammensetzung aus vielen Einzelstrukturen $\rho_i(x_i\ y_i\ z_i)$ angesehen werden. Durch die definierte Anlagerung eines weiteren Streuers H entstehen neue $F_{K,H}$, die sich aus der Addition der ursprünglichen F_K und dem Beugungsbild des modifizierenden Reagenz F_H ergeben. Wenn es gelingt, F_H aus den modifizierten Strukturfaktoramplituden $|F_{K,H}|$ zu extrahieren, kann über die Phase von F_H die Phase von F_K eingeschränkt werden.

Für zentrische Reflexe (Strukturfaktoren, deren Phase α nur zwei Werte mit der Differenz von π annehmen kann) gilt:

$$\begin{aligned} |F_{K,H}| &= |F_K| \pm |F_H| \\ \Rightarrow |F_H|^2 &= (|F_{K,H}| - |F_K|)^2 \end{aligned} \tag{II.26}$$

$|F_H|^2$ entspricht dem Intensitätsunterschied des zentrischen Reflexes zwischen nativer und durch Einlagerung eines weiteren Streuers modifizierter Kristallstruktur. Aus den Differenzen läßt sich dann eine Pattersonfunktion P_H nur für H berechnen. Da diese in der Regel sehr einfach geartet ist, kann die Position des zusätzlichen Streuers in der Elementarzelle aus P_H bestimmt werden. Damit ist eine Möglichkeit gegeben, für alle Reflexe ($h\ k\ l$) einen Strukturfaktor von H zu berechnen. Bekannt sind an diesem Punkt $|F_K|$, $|F_{K,H}|$ und F_H . Abb.II.6 zeigt schematisch, wie hieraus die Phase von F_K ermittelt wird:

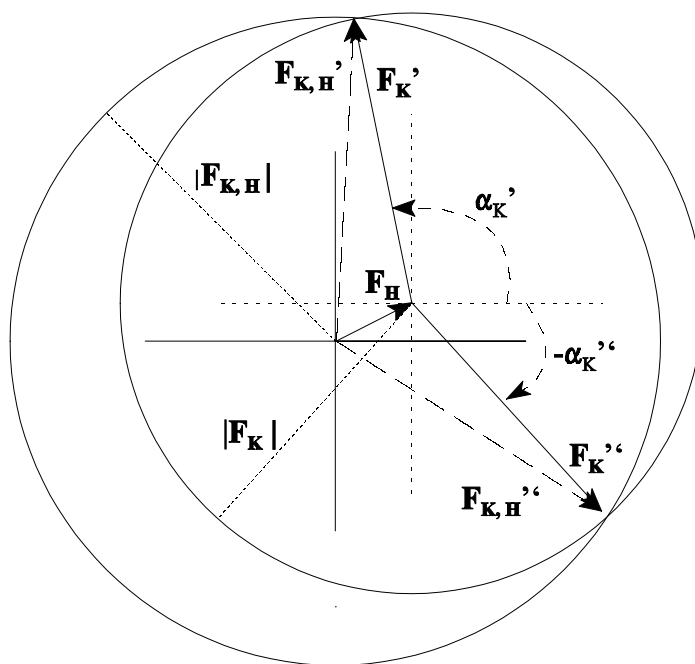


Abb. II.6: Die Bestimmung von nativen Strukturfaktoren F_K mit der Schwermetallmethode.

Die möglichen Phasen von F_K ergeben sich aus den Schnittpunkten der Kreise mit dem Radius $|F_{K,H}|$ bzw. $|F_K|$. Allerdings liefert diese Methode für eine Derivatstruktur zwei Ergebnisse (α_K' und $-\alpha_K''$), so daß für die Festlegung des tatsächlichen Wertes normalerweise zwei verschiedene Modifikationen anzubringen sind.

Als zusätzlicher Streuer H werden meistens Schwermetallatome verwendet, da die Strukturfaktoramplitude $|F_H|$ von der Anzahl der Elektronen abhängig ist und so ein maximaler Intensitätsunterschied zwischen Nativ- und Derivatmessung erzielt werden kann.

Experimentell wird die Derivatisierung durch Tränken von Proteinkristallen mit gelösten Schwermetallverbindungen durchgeführt. Als problematisch erweisen sich dabei oft die Nichtisomorphie von nativen und getränkten Kristallen, die Schwäche der Amplitudenveränderung

sowie die Nichtvorhersagbarkeit der Affinität des Metalls zum Protein.

Es besteht die Möglichkeit, Phaseninformation aus verschiedenen Quellen miteinander zu kombinieren. Dabei können Gewichtungsfaktoren, die den entsprechenden Phasenwert nach seiner Zuverlässigkeit berücksichtigen, eingeführt werden.

II.9 Strukturverfeinerung

Mit den nach Methode II.8.a oder II.8.b bestimmten Phasen lassen sich initiale Elektronendichtekarten berechnen. Diese weisen in der Regel nur eine schlechte bis mittelmäßige Qualität auf, denn bei einem Molekularen Ersatz werden gemessene Strukturfaktoramplituden mit den Phasen eines lediglich ähnlichen Proteinmoleküls kombiniert, während bei der Schweratommethode statistische Meßfehler zu einer Phasenungenauigkeit führen. Um sich an die tatsächliche Elektronendichte anzunähern, muß die Phaseninformation daher verfeinert werden. Dies ist ein iterativer Prozeß, bei dem manuelle Korrekturen und computergestützte Methoden ineinandergreifen.

II.9.a Manuelle Verfeinerung

Wenn die Phasen anhand eines Strukturmodells berechnet und dann mit experimentell bestimmten $|F_{obs}|$ zu $\rho(x, y, z)$ zusammengebracht werden, ist die Elektronendichte sowohl durch das Modell als auch durch das untersuchte Protein beeinflusst. Bei hinreichender Phasengenauigkeit sind Abweichungen zwischen beiden Strukturen zu erkennen, und das Modell kann entsprechend verändert werden. Hiermit lassen sich neue Phasen bestimmen, bis das Ausgangsmodell schließlich in die tatsächliche Struktur transformiert ist.

II.9.b Computerverfeinerung

Proteinmoleküle bestehen normalerweise aus mehreren tausend Atomen, für die jeweils vier Parametern (drei Koordinaten und ein isotroper Temperaturfaktor) zu bestimmen sind. Mit der manuellen Verfeinerung wird immer nur die Position weniger Atome gleichzeitig verändert, wobei aufgrund der Eigenschaften der Fouriertransformation (Glg. II.14) die lokale Elektronendichte durch falsche Koordinaten an anderer Stelle des Modells mitbeeinflusst wird.

Ein Verfahren, bei dem die Parameter sämtlicher Atome gleichzeitig angepaßt werden, erleichtert den Verfeinerungsprozeß erheblich, erfordert aber aufgrund der großen Anzahl von Parametern den Einsatz von Computern.

II.9.b.1 Least-Squares Refinement

Den atomaren Parametern der zu bestimmenden Struktur und des Modells stehen die Beobachtungen $|F_{obs}|$ und die berechneten $|F_{calc}|$ gegenüber. Hieraus wird eine Funktion konstruiert, die nach ihrer Minimierung einen Ausdruck für die nötigen Modellparameterveränderungen zur Anpassung von $|F_{calc}|$ an $|F_{obs}|$ liefert. Eine solche Funktion ist:

$$Q = \sum_{hkl} w(hkl) \cdot (|F_{obs}(hkl)| - |F_{calc}(hkl)|)^2 \quad (\text{II.27})$$

Sie wird beim "Least-Squares Refinement" verwendet. Der Faktor $w(hkl)$ gewichtet jeden Summanden, z.B. nach der Varianz der gemessenen Strukturfaktoramplitude ($w(hkl) = 1/\sigma^2(|F_{obs}|)$). Damit wird sichergestellt, daß die Gesamtfunktion Q von Meßwerten hoher Qualität beherrscht wird. Durch die Quadrierung wird zum einen jeder Term positiv und liefert zum anderen einen umso größeren Beitrag zu Q , je stärker die Abweichung zwischen den beiden Amplituden ist.

Am Minimum ist die Ableitung von Q bzgl. des atomaren Parameters u_j Null. Die einzige Größe, die in Glg. II.27 von u_j abhängt, ist $|F_{calc}|$. Um einen möglichst einfachen Ausdruck für diese Abhängigkeit zu erhalten, wird $|F_{calc}|$ in eine Taylorreihe um den Wert von u_j vor der Verfeinerung $u_{j,s}$ entwickelt. Diese Reihe wird nach den linearen Gliedern abgebrochen, und es ergibt sich der Zusammenhang:

$$\begin{aligned} & \sum_i \varepsilon_i \cdot \sum_{hkl} w \left[\frac{\partial |F_{calc}(u)|}{\partial u_i} \right]_{u_{j,s}} \cdot \left[\frac{\partial |F_{calc}(u)|}{\partial u_j} \right]_{u_{j,s}} \\ &= \sum_{hkl} w \cdot (|F_{obs}| - |F_{calc}(u_{j,s})|) \cdot \left[\frac{\partial |F_{calc}(u)|}{\partial u_j} \right]_{u_{j,s}} \end{aligned} \quad (\text{II.28})$$

Die gesuchte Verschiebung der N Atomparameter in Richtung Minimum ist in den Termen $\varepsilon_i = u_i - u_{i,s}$ enthalten. Alle anderen Terme der Gleichung sind bekannt.

Um die gesuchten Verschiebungen ε_i zu bestimmen, muß für jedes der u_j eine Beziehung wie Glg. II.28 aufgestellt werden, so daß ein System mit N Gleichungen entsteht. Diese besitzen die allgemeine Form $\sum_i \varepsilon_i a_{ij} = b_j$ (a_{ij} entspricht dem Summenausdruck über hkl auf der linken Seite von Glg. II.28, und die Terme rechts sind in b_j zusammengefasst). Das Gleichungssystem kann daher auch mit einer $N \times N$ -Matrix $[A]$ und den Vektoren $[\varepsilon]$ und $[b]$ im N -dimensionalen Vektorraum geschrieben werden:

$$\begin{aligned}
 [A] \cdot [\epsilon] &= [b] \\
 \Rightarrow [\epsilon] &= [A]^{-1} \cdot [b]
 \end{aligned}
 \tag{II.29}$$

Das eigentliche Problem bei der Ermittlung von $[\epsilon]$ besteht also darin, die Matrix $[A]$ zu invertieren. Zur Vereinfachung werden häufig alle Elemente von $[A]$, die nicht auf der Hauptdiagonalen liegen, gleich Null gesetzt, d.h. die Atomparameter werden als untereinander nicht korreliert angesehen.

Nach der Inversion kann der Verschiebungsvektor $[\epsilon]$ berechnet und auf die Koordinaten $u_{j,s}$ angewendet werden. Damit haben sich alle Parameter gleichzeitig verbessert.

Da die nach den linearen Gliedern abgebrochene Taylorreihe nur eine Näherung darstellt, konvergiert das Verfahren nicht nach einem Schritt, so daß die Rechnung ausgehend von den neuen Parametern mehrfach wiederholt werden muß.

II.9.b.2 Maximum-Likelihood Refinement

Eine generellere Beschreibung des Verfeinerungsproblems wird mit Hilfe statistischer Methoden abgeleitet. Das Ziel der Verfeinerung ist es, für das System den Parametersatz mit der größtmöglichen Wahrscheinlichkeit (engl. maximum likelihood) unter Berücksichtigung der statistischen Eigenschaften der Meßwerte zu bestimmen. Die genauen Zusammenhänge sind in der Literatur beschrieben (Murshudov *et al.*, 1997). An dieser Stelle soll lediglich gezeigt werden, welche Prinzipien dem Verfahren zugrunde liegen und daß die klassische Least-Squares-Prozedur eine vereinfachte Version der moderneren Maximum-Likelihood-Methode darstellt.

Alle Techniken zur Verfeinerung von makromolekularen Strukturen basieren auf der Möglichkeit, Vorabinformation (s. Kap. II.9.b.3) und experimentelle Daten (Strukturfaktoramplituden) miteinander zu kombinieren. Die Wahrscheinlichkeitsrechnung gibt mit dem “Satz von Bayes” eine Verteilungsfunktion des Parameters u , wenn die experimentellen Daten $|F_{obs}|$ bekannt sind (eine sog. “abhängige Wahrscheinlichkeit” oder “Wahrscheinlichkeit a posteriori”, $P(u; |F_{obs}|)$):

$$P(u; |F_{obs}|) = \frac{p(u) \cdot P(|F_{obs}|; u)}{P(|F_{obs}|)}
 \tag{II.30}$$

Die Vorabinformation über die Parameter ist in $p(u)$ enthalten. $P(|F_{obs}|)$ gibt Aufschluß über die Verteilung von $|F_{obs}|$ in Abhängigkeit von allen Parametern (“totale Wahrscheinlichkeit”).

Bei der Verfeinerung muß $P(u; |F_{obs}|)$ in Abhängigkeit von allen Reflexen maximiert werden.

Dies ist gleichbedeutend mit der Minimierung des Ausdrucks:

$$\begin{aligned}
 -\log P(u; |\mathbf{F}_{obs}|^{all}) &= -\log P(|\mathbf{F}_{obs}|) \\
 &- \log p(u) \\
 &- \sum_{hkl} \log P(|\mathbf{F}_{obs}|; |\mathbf{F}_{calc}|)
 \end{aligned} \tag{II.31}$$

Im Summenterm ist u gegen $|\mathbf{F}_{calc}|$ ersetzt, weil über die Fouriertransformation ein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Größen besteht.

Wenn für $P(|\mathbf{F}_{obs}|; |\mathbf{F}_{calc}|)$ eine Gaußverteilung von $|\mathbf{F}_{obs}|$ um den Erwartungswert $|\mathbf{F}_{calc}|$ angenommen wird,

$$P(|\mathbf{F}_{obs}|; |\mathbf{F}_{calc}|) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \frac{(|\mathbf{F}_{obs}| - |\mathbf{F}_{calc}|)^2}{\sigma^2}} \tag{II.32}$$

geht Glg. II.31 bei Nichtbeachtung der Vorabinformation $p(u)$ und nach Ableitung zum Parameter u in den Least-Squares-Formalismus über. Die Verwendung einer Gaußverteilung ist aber für Strukturfaktoramplituden nur eine grobe Näherung. Bei genauerer Analyse müssen wesentlich komplexere Ausdrücke verwendet werden, die auch den mittleren Koordinaten- und Temperaturfaktorfehler des momentanen Modells mit berücksichtigen. Diese haben zumindest bei einem schlechten Modell einen größeren Einfluß auf die Verfeinerung als statistische Meßfehler. Die genauere Behandlung macht die Maximum-Likelihood-Methode der Least-Squares-Verfeinerung überlegen, was sich in kleineren R-Werten (Glg. II.24) der so verfeinerten Strukturen ausdrückt.

II.9.b.3 Probleme bei der Computerverfeinerung

Unterbestimmtheit

Proteinkristalle streuen das Röntgenlicht meistens nur bis zu einer begrenzten Auflösung (2 - 3 Å). Dies bedeutet, daß für die Verfeinerung weniger Reflexe zur Verfügung stehen als Koordinaten bzw. Temperaturfaktoren zu bestimmen sind. Um auch unter diesen Umständen eine eindeutige Struktur zu ermitteln, müssen zusätzliche Informationen in Form von stereochemischen Randbedingungen in die Minimierung eingebracht werden. Diese lassen sich aus den Strukturen kleiner Moleküle wie Aminosäuren oder kurzen Peptiden gewinnen und als Bindungslängen, Bindungswinkel oder Van-der-Waals-Abstände in der Verfeinerung berücksichtigen, da davon ausgegangen werden kann, daß sie auch für Proteine gültig sind. Der von

den Parametern umschriebene Konformationsraum wird hierdurch erheblich eingeschränkt, so daß sich auch die Gefahr der Nichtkonvergenz verringert.

Grundsätzlich lassen sich die stereochemischen Parameter als absolut ansehen, so daß sie als Zwang (engl. constraint) wirken und nur Diederwinkel verändert werden dürfen, oder sie werden als einschränkende Rückstellkräfte (engl. restraint) mit eingebracht. Die Restrain-Methode ist wesentlich weiter verbreitet, weil sie eine einfachere Bewegung von kleinen Bereichen des Moleküls zuläßt. Außerdem trägt sie mehr der Beobachtung Rechnung, daß die Parameter niemals exakt einem Idealwert gehorchen, sondern eine gewisse Verteilung um diesen herum aufweisen.

Die im Least-Squares-Verfahren zu minimierende Funktion Q (Glg. II.27) nimmt dann folgende Form an (Restrained Least Squares Refinement):

$$\begin{aligned}
 Q = & \sum_{hkl} w(hkl) \cdot (|F_{obs}(hkl)| - |F_{calc}(hkl)|)^2 \\
 & + \sum_{dist. j} w_D(j) \cdot (d_j^{ideal} - d_j^{model})^2 \\
 & + +
 \end{aligned}
 \tag{II.33}$$

w_D gibt als Gewichtungsfaktor eine Art Federkonstante für die Abweichung zwischen dem idealen Bindungsabstand d_j^{ideal} und dem momentanen Wert im Modell d_j^{model} an. w_D kann z.B. als $1/\sigma_D^2$ die Varianz des Idealwerts d_j^{ideal} in die Gleichung mit einfließen lassen. Die nicht gezeigten Terme für andere "Restraints" sind ähnlich geartet.

Durch die Einführung von stereochemischen Randbedingungen werden die atomaren Parameter untereinander hochgradig korreliert, so daß die Matrizes in Glg. II.29 nicht länger als Diagonalmatrizes angenommen werden können. Die Inversion wird hierdurch deutlich komplizierter.

Überverfeinerung

Um den Fortschritt der Computerverfeinerung zu beobachten, wird der R-Wert nach Glg. II.24 verwendet. Hierbei besteht jedoch die Gefahr der "Überverfeinerung": der R-Wert wird sich bei der Minimierung nach Glg. II.27 bzw. II.33 immer verbessern, ohne daß zwangsläufig auch die stereochemischen Parameter des Strukturmodells den Idealwerten zustreben. Um dieser Gefahr entgegenzutreten, wird in der Proteinkristallografie zusätzlich ein sog. Freier R-Wert verwendet. Hierfür wird zu Beginn der Verfeinerung ein Bruchteil der beobachteten Reflexe zufällig ausgewählt (typischerweise 5%) und nicht in die Minimierung miteinbezogen. Nur wenn sich auch der für diese Reflexe separat zu berechnende R-Wert verbessert, strebt die Verfeinerung

der tatsächlichen Struktur entgegen.

Konvergenzradius

Ein weiteres Problem besteht im Konvergenzradius der Minimierung, d.h. der maximal möglichen Abweichung des Ausgangsmodells, die die Verfeinerung noch zur tatsächlichen Struktur führen kann. Q ist eine Funktion, die von einigen tausend Parametern abhängig ist und entsprechend viele lokale Minima besitzt. Ausgehend von den momentanen Modellparametern kann ihre Optimierung nur zum nächstgelegenen lokalen Minimum führen, da Schritte entgegen dem Gradienten nicht möglich sind. Grobe Fehler in der Struktur können somit nicht rechnerisch berichtigt werden, wenn dafür die Überwindung einer Barriere in Q nötig ist.

Eine Möglichkeit, diesem Problem entgegenzutreten, besteht darin, die Funktion Q als Beschreibung der potentiellen Energie des Systems anzusehen und dem Molekül vor der Verfeinerung rechnerisch eine Energie in der Art einer Temperatur bzw. kinetischen Energie der einzelnen Atome nach der Maxwell-Boltzmann-Statistik zuzuweisen. Die Ableitung von E_{pot} liefert dann eine Kraft in Richtung des Gradienten der Funktion, die über die Newton'schen Bewegungsgleichungen in eine Beschleunigung umgewandelt werden kann:

$$-\frac{\partial E_{\text{pot}}}{\partial \mathbf{r}_i} = m_i \cdot \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} \quad (\text{II.34})$$

Diese Beschleunigung kann im Grenzfall entgegen oder in Richtung des Ausgangsgeschwindigkeitsvektors wirken. Sie wird für einen kurzen Zeitraum auf die Atome angewendet, so daß diese eine neue Geschwindigkeitskomponente erhalten. Wenn die Ausgangsgeschwindigkeit ausreichend groß und der neuen Geschwindigkeitskomponente entgegengerichtet ist, bewegen sich die Atome anschließend gegen den durch die Energiefunktion vorgegebenen Gradienten. So können sie einem lokalen Minimum entkommen, um anschließend möglicherweise in den Bereich eines steileren Gradienten eines günstigeren Energieminimums zu geraten. Im anderen Fall erhöht sich ihre Geschwindigkeit und damit die Temperatur in dem lokalen Bereich. Das Molekül wird rechnerisch mit einem Temperaturbad gekoppelt, so daß Atome, die zu schnell geworden sind, Energie abgeben können, während an anderen Stellen Energie wieder zugeführt werden kann. Die Atome dürfen sich für einen Moment mit den neuen Geschwindigkeiten bewegen, dann werden diese neu skaliert und neue Beschleunigungen berechnet.

Über das Temperaturbad besteht die Möglichkeit, die Gesamttemperatur zu kontrollieren. Durch eine langsame Abkühlung wird erreicht, daß dem System immer mehr Bewegungsenergie entzogen wird, so daß es schließlich im Bereich eines neuen Minimums endet.

Wegen der Ähnlichkeit zum Tempern von Glas (Schmelzen und langsames Abkühlen, um Spannungen aus dem Material zu entfernen) wird diese Methode Simulated Annealing genannt. Da der Verlauf der Moleküldynamik von den zufällig gewählten Anfangsgeschwindigkeiten abhängig ist, werden mehrere Läufe mit verschiedenen Startbedingungen durchgeführt und die Struktur mit den günstigsten R-Werten ausgewählt.

Auch durch das Simulated Annealing wird der Konvergenzradius nicht so stark erweitert, daß die Strukturverfeinerung allein mit dem Computer durchgeführt werden kann, wenn die Ausgangskoordinaten noch weit von der endverfeinerten Struktur entfernt ist. In der Praxis müssen sich daher die Verfeinerung durch manuellen Eingriff und durch den Computer abwechseln.

II.9.b.4 Elektronendichtemodifikation

Die Qualität der Elektronendichtekarten kann oft noch erhöht werden, wenn Informationen, die unabhängig von den Parametern einzelner Atome sind, in die Berechnung miteinbezogen werden. Besonders zu Beginn einer Verfeinerung, wenn noch große Teile der Struktur ungenau bestimmt sind, können solche Modifikationen die Arbeit erleichtern.

Mittelung

Das Vorliegen von nichtkristallografischer Symmetrie führt zu einer Redundanz im Röntgen Datensatz, die zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses verwendet werden kann. Dafür wird entweder die Elektronendichte der über nichtkristallografische Symmetrie verwandten Bereiche gleichgesetzt (Mittelung im realen Raum), oder die über die Rotationsmatrix des nichtkristallografischen Symmetrieoperators miteinander in Beziehung stehenden Strukturfaktoren bzw. Strukturfaktoramplituden werden gemittelt (Mittelung im reziproken Raum). Die Elektronendichte verstärkt sich mit dem Faktor $1/\sqrt{N}$ gegenüber dem Hintergrund, wenn die asymmetrische Einheit N Kopien des Moleküls besitzt. Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Methode ist, daß sowohl die nichtkristallografischen Symmetrieoperatoren als auch die ungefähre Gestalt des Moleküls bekannt sind.

Solvensglättung

Das Solvens in den Lösemittelkanälen eines Proteinkristalls liefert ebenfalls einen Beitrag zum Beugungsbild und sollte zur Verbesserung der Modellanpassung an die reale Struktur berücksichtigt werden. Damit gewinnt die Phaseninformation an Qualität, und die Elektronendichtekarten werden klarer. Außerdem erhalten die Computerverfeinerungstechniken einen realistischen Konvergenzpunkt.

Zum Gesamtbeugungsbild tragen sowohl am Protein gebundene und damit zumindest zeitweise

geordnete als auch ungeordnete Lösungsmittelmoleküle in den Kanälen bei:

$$\mathbf{F}_{total} = \mathbf{F}_{prot} + \mathbf{F}_{solv, bound} + \mathbf{F}_{solv, bulk} \quad (\text{II.35})$$

Die gebundenen Solvensmoleküle können nach der Lokalisierung wie die Atome des Proteinmoleküls verfeinert werden. Demnach muß lediglich der Strukturfaktor $\mathbf{F}_{solv, bulk}$ berechnet werden.

In den einfachsten Modellen werden dem ungeordneten Lösungsmittel eine einheitliche Dichte und ein einheitlicher Temperaturfaktor zugewiesen. Damit besteht neben dem Protein ein großer Körper ohne Feinstruktur, der nur einen Beitrag zu den Reflexen niedriger Auflösung leistet. Für die Verfeinerung wird deswegen entweder eine relativ scharfe untere Auflösungsgrenze eingeführt (z.B. 8 - 10 Å), was gleichbedeutend mit der Vernachlässigung des ungeordneten Lösungsmittels ist, oder die $\mathbf{F}_{solv, bulk}$ werden nach dem "Babinet-Prinzip" mit einer auflösungsabhängigen Skalierungsfunktion aus den Proteinstruktur Faktoren berechnet:

$$\mathbf{F}_{solv, bulk} = -K \cdot \mathbf{F}_{prot} \cdot e^{-\frac{B_{solv}}{4d^2}} \quad (\text{II.36})$$

Aufwendigere Methoden verwenden ein iteratives Verfahren, das ein Lösungsmittelmodell im Bereich einer Solvensmaske über eine Differenzfouriertransformation aus den Meßwerten $|\mathbf{F}_{obs}|$ und den $|\mathbf{F}_{prot, calc}|$ des momentanen Proteinstrukturmodells erzeugt. Die Solvensmaske kann dabei entweder direkt aus den Koordinaten des Modells oder aus der Elektronendichte unter Berücksichtigung des Lösungsmittelgehalts bestimmt werden. Es stellt sich heraus, daß die Lösungsmitteldichte keineswegs uniform ist, sondern daß in unmittelbarer Nähe des Proteins eine schichtartige Solvensstruktur existiert, die von den Eigenschaften der Oberfläche (hydrophil oder hydrophob) abhängig ist und sich vom unstrukturierten Innern der Kanäle unterscheidet (Jiang & Brünger, 1994).

Die $\mathbf{F}_{solv, bulk}$ lassen sich als Solvenskorrektur zwischen verschiedenen Verfeinerungsprogrammen transferieren, so daß eine optimale Strategie unter Ausnutzung der Stärken verschiedener Programmpakete entwickelt werden kann.

Histogrammanpassung

Die Elektronendichte eines Proteins weist eine bestimmte theoretische Verteilung (Histogramm) auf, die mit Hilfe der Fouriertransformation berechnet werden kann. Durch die Anpassung der aus den experimentellen Daten und dem zur Verfügung stehenden Phasensatz berechneten Elektronendichtekarte an ein ideales Histogramm kann daher die Phaseninformation verbessert werden. Damit läßt sich ein besserer Kontrast in der Elektronendichtekarte erzielen, und somit wird das Auffinden neuer Strukturdetails erleichtert.

Skeletonisierung

Bei nichtatomarer Auflösung ist die Elektronendichte eines Proteins aufgrund der linearen Verknüpfung der Aminosäuren schlauchförmig. Der Computer kann dieses Muster in der Elektronendichtekarte identifizieren und es dann durch Einsetzen eines Modells mit der Elektronendichteverteilung einer Kohlenstoffkette idealisieren. Mit einem derartigen Skelettmodell werden neue Phasen und anschließend neue Elektronendichtekarten berechnet, die sich erneut skeletonisieren lassen. Der Prozeß wird so oft wiederholt, bis sich keine Verbesserung mehr ergibt.

Diese Methode eignet sich besonders zur Verbesserung von Phasen, die mit der Schwermetallatommethode bestimmt worden sind, da hier noch keine Modellinformation in der Elektronendichtekarte enthalten ist. Beim Molekularen Ersatz ist der Einsatz weniger erfolgversprechend, da die bereits modellierten Bereiche eine stärkere Elektronendichte als fehlende Regionen aufweisen, so daß letztere bei der Skeletonisierung durch den Computer verloren gehen können.

III. Methoden

In diesem Kapitel sind die Methoden, die für die Strukturaufklärung von Tyrosin-Aminotransferase aus *Trypanosoma cruzi* verwendet wurden, wiedergegeben. Eine Auflistung von Geräten, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Computersystemen sowie in diesem Abschnitt nicht aufgeführten Computerprogrammen befindet sich im Anhang.

III.1 Proteinreinigung

Die Tyrosin-Aminotransferase wurde an der Universidad de Buenos Aires aus kultivierten Epimastigoten von *Trypanosoma cruzi*, Tulahuén-Stamm Tul 0, isoliert (Montemartini *et al.*, 1993). Im Rahmen der Kristallisationsexperimente ist lediglich an einigen Proteinchargen eine Nachreinigung mittels Gelfiltration auf Superdex-200 im Elutionspuffer der letzten Ionenaustauschersäule (20 mM Triethanolamin, 1mM EDTA, zusätzlich 1mM DTT, 150 mM NaCl, pH 7.6) durchgeführt worden.

Pufferaustausche und Aufkonzentrierungen erfolgten durchgehend mit zentrifugierten Ultrafiltratoren.

Vor der Kristallisation wurden die Proteinlösungen sterilfiltriert und in kleinen Aliquots (50 - 100 µl) bei -20°C gelagert.

III.2 Analytik

III.2.a Reinheit

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde vornehmlich die Gelelektrophorese mit SDS-PAGE, Nativgel und isoelektrischer Fokussierung eingesetzt. Andere Methoden wie MALDI-MS, Aminosäureanalyse oder N-terminale Ansequenzierung liefern ebenfalls einen Hinweis auf die Sauberkeit, wurden aber primär zur Gewinnung von Informationen über Vollständigkeit oder terminale Blockierung des Proteins verwendet.

III.2.b Konzentration

Während der Laborarbeiten erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Bradford-Assay gegen einen IgG-Standard (Bradford, 1976). Zusätzlich wurden alle in der Kristallisation eingesetzten Enzymlösungen einer Aminosäureanalyse unterzogen. Dabei wird das Protein in 6N HCl hydrolysiert und das Aminosäuregemisch mit chromatografischen Techniken aufgetrennt. Die Fläche unter den Peaks im Chromatogramm liefert dann die Konzentration der jeweiligen Aminosäure.

III.2.c Molekulargewicht

Die Überprüfung des Molekulargewichts der *T. cruzi*-TAT aus verschiedenen Proteinchargen erfolgte mit Hilfe der Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-Of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS). Dazu wird 1 µl Proteinlösung (Konzentration ca. 0.1 mg/ml) mit 1 µl Sinapinsäurelösung versetzt und dann getrocknet. Das Protein wird dabei in die Matrix der organischen Säure eingebettet und protoniert. Beim Beschießen dieses Kokristallisats mit Laserlicht lösen sich geladene Eiweißmoleküle aus der Matrix ab und können im Anschluß in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Über die Zeit, die die Moleküle von der Ablösung bis zum Auftreffen auf einen Detektor benötigen, wird ihre Masse berechnet. Ein großer Vorteil der MALDI-Methode ist, daß die Makromoleküle in der Regel nicht fragmentieren und häufig nur einfach aufgeladen werden, so daß sich die Molmasse direkt ablesen läßt.

Experimentelle Hinweise auf das Molekulargewicht konnten auch aus der Gelelektrophorese (SDS-PAGE und Nativgel) sowie aus dem durch die Proteinlösung dynamisch gestreuten Laserlicht gewonnen werden.

III.2.d N-terminale Sequenzierung

Proteine lassen sich vom N-Terminus ausgehend chemisch Aminosäure für Aminosäure abbauen (Edman-Abbau). Die abgespaltenen Aminosäuren werden über ihr chromatografisches Verhalten identifiziert. Damit läßt sich nicht nur die Primärstruktur bestimmen, sondern gleichzeitig Erkenntnis über proteinogene Kontaminationen und eine eventuelle N-terminale Blockierung durch chemische Modifikation gewinnen.

Die Aminosäuresequenz der *T. cruzi*-TAT lag schon zu Beginn der Kristallisationsversuche vor. Da aber auch am Ende der Strukturverfeinerung weder die drei N-terminalen Aminosäurereste noch irgendeine andere chemische Modifikation in der Elektronendichte erkennbar wurden, wurde das noch verbliebene Proteinmaterial auf eine Blockierung des Kettenanfangs getestet.

III.2.e Aggregationsstatus

Unspezifische Proteinaggregate, die die Kristallisation beeinträchtigen können, lassen sich mittels Dynamischer Lichtstreuung nachweisen.

Die Proteinlösung wird dabei zur Entfernung größerer Partikel zunächst gefiltert und dann mit Laserlicht bestrahlt. Das gestreute Licht wird in einem Winkel von 90° zum Primärstrahl mit einem schlitzförmigen Detektor aufgezeichnet. Da das verwendete Laserlicht eine Wellenlänge besitzt, die einem Vielfachen des Moleküldurchmessers von Proteinen entspricht, läßt sich die Winkelabhängigkeit der Intensität des Streulichts mit der Rayleigh-Streu-Beziehung beschreiben. Über die durch die Brown'sche Molekularbewegung verursachte zeitliche Fluktuation des Detektorsignals kann mit einer Autokorrelationsanalyse der Translationsdiffusionskoeffizient

D_T der streuenden Komponenten in der Lösung bestimmt werden. Dieser steht mit dem hydrodynamischen Molekularradius R_H über die Einstein-Stokes-Beziehung in Verbindung:

$$R_H = \frac{k_b T}{6\pi\eta D_T} \quad (\text{III.1})$$

k_b ist die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur und η die Viskosität der Lösung. Durch die Autokorrelationsanalyse kann außerdem festgestellt werden, ob nur eine gelöste Spezies zum gestreuten Licht beiträgt (monomodale Auswertung) oder ob und in welchem ungefähren Verhältnis andere Komponenten mit verschiedenen Molekulargewichten in der Lösung vorhanden sind (bimodale Auswertung).

III.2.f Enzymaktivität

Die in dieser Arbeit aufgeführten Angaben zur Substratspezifität und zu kinetischen Parameter der *T. cruzi*-TAT beruhen auf zwei unterschiedlichen Aktivitätstests.

Apparente K_m und V_{max} -Werte wurden mit einem gekoppelten Enzymtest aus TAT und p-Hydroxyphenyl-Lactat-Dehydrogenase, ebenfalls aus *T. cruzi*, gemessen (Montemartini *et al.*, 1993). Der Test verfolgt die Oxidation von NADH bei 340 nm, wobei die Startkonzentration des zweiten, nichtuntersuchten Substrats der Aminotransferase konstant bleibt (Abb. III.1, A). Die Fähigkeit, auch Aminosäuren, deren Produkte nicht mit der Lactat-Dehydrogenase nachweisbar sind, umzusetzen, wurde mit einem Assay, das an die zweite Halbreaktion der Transaminase angegliedert ist, getestet (Rej, 1982; Abb. III.1, B). Das mit der Glutamat-Dehydrogenase (aus Rind, EC 1.4.1.3) gebildete NADH erzeugt den roten Farbstoff INT_{red} (INT: [2-(p-Iodphenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolchlorid) unter Katalyse durch Diaphorase (Lipoamiddehydrogenase aus *Clostridium kluyveri*, EC 1.6.4.3). Die Reaktion wird bei 500 nm beobachtet.

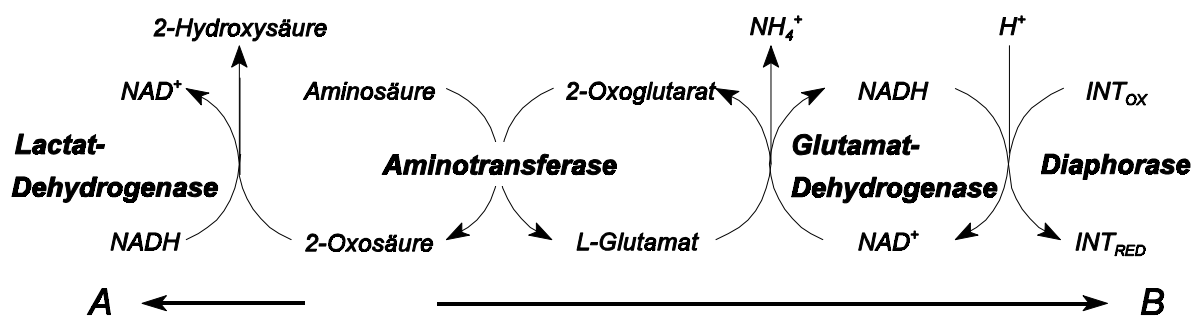


Abb. III. 1: Aktivitätstests für Aminotransferasen

III.3 Kristallisation

Für die Kristallisation ist es erforderlich, die Proteinlösung langsam in den Übersättigungsbereich zu bringen. Dazu werden hydrophile Substanzen wie Ammoniumsulfat oder Polyethylenglycole (PEG's) als Fällungsmittel eingesetzt, die mit dem Protein um das solvatisierende Wasser konkurrieren.

In der Praxis haben sich verschiedene Kristallisationsmethoden etabliert, von denen zwei im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

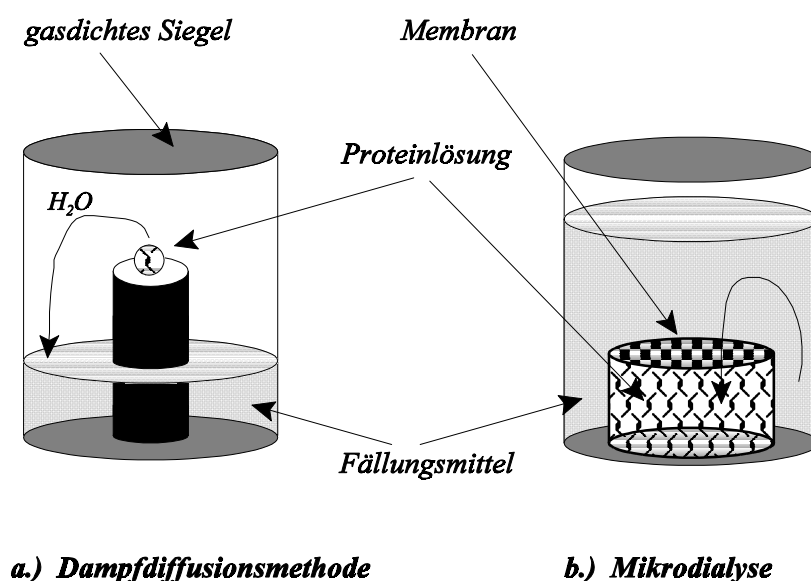


Abb. III. 2: Kristallisationstechniken:
a.) Dampfdiffusionsmethode mit sitzendem Tropfen,
b.) Mikrodialyse

Dampfdiffusionsmethode

In einem versiegelten Gefäß steht ein Proteintropfen über die Dampfphase mit einem Fällungsmittelreservoir in Kontakt (Abb. III.2.a). Damit der Tropfen nicht vollständig austrocknen kann, wird er vor dem Versiegeln mit etwas Reservoirlösung versetzt. Über das Verhältnis von zugegebener Fällungsmittellösung zur Proteintropfengröße kann die Endkonzentration bestimmt werden, denn es verdunstet solange Wasser aus der Proteinlösung, bis der Präzipitant in Proteintropfen und Reservoir gleich stark konzentriert ist.

Da für den einzelnen Tropfen nur geringe Proteinmengen eingesetzt werden müssen (typischerweise 2 - 10 µl), eignet sich diese Methode besonders zur Optimierung von Kristallisationsbedingungen.

Mikrodialyse

Sofern optimale Kristallisationsbedingungen bekannt sind, können auch größere Proteinmengen zur Kristallisation gebracht werden. In der Mikrodialyse wird ein mit einer Membran versiegelter Lösungscontainer (Volumen 5 - 200 μ l) in ein Fällungsmittelreservoir getaucht. Der Präzipitant kann durch die Membran durchtreten, so daß sich seine Konzentration im Container langsam erhöht (Abb. III.2.b). Mit dieser Methode kann das Protein nicht weiter aufkonzentriert werden, weil das Containervolumen konstant ist. Dafür können jedoch die Fällungsbedingungen durch Umsetzen nachträglich variiert werden. Außerdem verdünnen sich während der Dialyse eventuell störende Zusätze (Salze, Puffer etc.) in der Proteinlösung, wohingegen sie bei der Dampfdiffusionmethode im Kristallisationstropfen verbleiben.

Ein vereinfachtes Phasendiagramm zur Verdeutlichung des Unterschiedes zwischen beiden Methoden zeigt Abb. III.3.

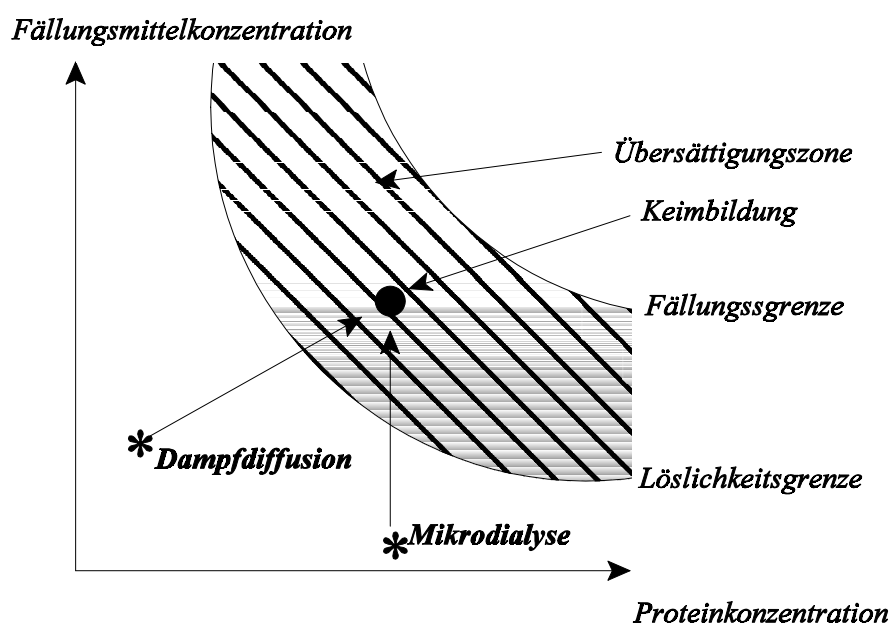


Abb. III. 3: Unterschied zwischen Mikrodialyse und Dampfdiffusion

Aufgrund der Variationsvielfalt und dem damit verbundenen Proteinverbrauch ist es nicht möglich, alle Parameter, die einen Einfluß auf das Kristallisationsverhalten eines Proteins ausüben könnten (pH-Wert, Temperatur, Fällungsmittelart und -konzentration, Pufferzusammensetzung, weitere Zusätze wie Kofaktoren, Substrate oder Detergenzien), systematisch zu testen. Deshalb wird zunächst mit "sparse matrix screens" nach initialen Kristallisationsbedingungen gesucht, die dann optimiert werden. In diesen Tests werden etwa 50 Standardansätze, die sich als "Mittelwert" erfolgreich durchgeführter Experimente ergeben haben, ver-

wendet (Jancarik & Kim, 1991).

Es besteht zudem die Möglichkeit, Kristalle, die für röntgenkristallografische Untersuchungen zu klein sind, durch Umsetzen in einen neuen Proteintropfen wachsen zu lassen (sog. Seeding).

Die Kristallisationsbedingungen für *T. cruzi*-TAT wurden mit der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Proteintropfen ermittelt. Das Mischen der Reservoirlösungen aus hochkonzentrierten Stammlösungen übernahm ein Pipettierroboter. Da die Konzentrationsgrenze der *T. cruzi*-TAT mit weniger als 3 mg/ml unter dem normalerweise für die Kristallisation verwendeten Bereich von etwa 10 mg/ml liegt, wurde für die Experimente mit sitzendem Tropfen nicht wie sonst üblich mit dem Volumenverhältnis 1:1, sondern mit 4 µl Protein und 2 µl Präzipitationslösung für die Tropfenzusammensetzung gearbeitet.

Getestet wurde weiterhin der Einfluß verschiedener Zusätze wie PLP, einiger Inhibitoren (D/L- α -Methylmethionin, D/L- α -Methyltyrosin) und diverser Substrate (Pyruvat oder α -Ketoglutarat). Methylmethionin und -tyrosin wurden als Pulver zu bereits ausgewachsenen Kristallen gegeben.

Ferner wurde versucht, die Kristallisation durch Addition von Detergentien (1% 1-O-Octyl- β -D-glucopyranosid, 1% Oktantriol) zu verbessern. Auch einige Seeding-Versuche sind durchgeführt worden.

Die Herstellung größerer Kristallmengen mittels Mikrodialyse erfolgte nach der Bestimmung optimierter Bedingungen. Um ein Reißen der Membran zu verhindern, wurde der Proteincontainer zunächst für einige Stunden gegen ein Reservoir mit verringerter Fällungsmittelkonzentration äquilibriert und dann in eine Lösung mit der endgültigen Konzentration umgesetzt. Die verwendeten Membranen besaßen eine Ausschlußgröße von 12000 Da.

III.4 Aufnahme der Röntgendaten

III.4.a Ermittlung von Cryobedingungen

Durch die Bestrahlung mit Röntgenlicht entstehen im Kristall Radikale, die durch die Lösungskanaläle wandern und zerstörende Kettenreaktionen auslösen können, so daß der Kristall mit zunehmender Meßdauer immer schlechtere Beugungseigenschaften aufweist. Dem Problem kann entgegengetreten werden, indem der Kristall während der Messung auf tiefe Temperaturen abgekühlt wird und so praktisch alle thermischen Bewegungen zum Stillstand gebracht werden. Dabei ist jedoch die Entstehung von Eis zu unterdrücken, denn dieses liefert ein eigenes überlagerndes Beugungsbild. Außerdem kann das Wasser den Kristall durch Ausdehnung beim Gefrieren beschädigen. Dieses läßt sich vermeiden, wenn der Kristall mit einem Frostschutzmittel (Präzipitationsgemisch mit zusätzlich relativ hohen Konzentrationen gut wasserlöslicher kleiner Moleküle wie Glycerin oder PEG 400) benetzt oder getränkt und dann in Flüssiggas oder

einem Kaltgasstrom aus verdampfendem Flüssigstickstoff schockgekühlt wird. Die Lebensdauer eines auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff gebrachten Kristalls im Röntgenstrahl reicht meistens für die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes aus.

T. cruzi-TAT-Kristalle wurden in einer Schleife aus Zahnseide mit Fällungsmittel, das durch verschiedene Glycerinmengen angereichert war, gewaschen und im N₂-Kaltgasstrom auf eine Temperatur von 100 K (Kühleinrichtung am Synchrotron) bzw. 135 K (Kühleinrichtung an der Drehanode) gebracht. Zuvor erfolgte ein Test über die Effizienz der Eisbildungsunterdrückung, indem nur etwas Frostschutzmittel in den verdampfenden Stickstoff gehalten und auf Trübung untersucht wurde. Die Verträglichkeit der gewählten Cryobedingungen für die Kristalle wurde anhand des Beugungsrandes einer Röntgenaufnahme beurteilt.

III.4.b Röntgenmessungen

Röntgendatensätze von *T. cruzi*-TAT-Kristallen wurden sowohl auf einem Vierkreisdiffraktometer, ausgestattet mit einem Drehanodenröntgengenerator und einem Flächenzähler, als auch an der MPG-GBF-Beamline BW6 der Hasylabs am DESY, Hamburg, ausgerüstet mit einer MAR-345mm-Imaging-Plate bzw. einem MAR-CCD-Detektor, auf einem Zweikreisdiffraktometer gemessen.

Einer der Drehanodendatensätze ist mit der Glaskapillarmethode bei 12°C unter Verwendung von fünf Kristallen aufgenommen worden. Die Kristalle werden hierfür zur Vermeidung von Austrocknung mit etwas Mutterlauge in einer Glaskapillare, Wandstärke 0.1 mm, montiert. Für alle anderen Messungen wurde die oben beschriebene Tieftemperaturmethode eingesetzt.

Zur Herstellung eines Quecksilberderivats wurde der Kristall vor der Bestrahlung für ca. 10 Stunden in 2 µl Mutterlauge mit zusätzlich 5 mM HgCl₂ umgesetzt.

III.4.c Datenindizierung, Integration und Reduktion

Die mit dem Flächenzähler aufgenommenen Rotationsbilder wurden mit dem X-gen-Modul aus der Cerius²-Software der Firma MSI (Biosym/MSI, 1996) indiziert, integriert und in Reflexdatensätze umgewandelt. Für die am Synchrotron mit der Imaging-Plate gemessenen Daten kamen die Programme DENZO 1.6.3 (Otwinowski, 1993) und MOSFLM 5.40 zum Einsatz, während die CCD-Detektor-Aufnahmen mit MOSFLM 5.51 ausgewertet wurden.

Zur Skalierung der Rotationsbilder innerhalb eines Datensatzes und zur Zusammenfassung der über mehrere Bilder verteilten Reflexe wurde SCALA 3.4 aus CCP4 verwendet. Bei den Drehanodendatensätzen kam die ältere SCALA 3.0/AGROVATA 3.0-Kombination und bei den DENZO-Integrationen SCALEPACK (Otwinowski, 1993) zum Einsatz.

Die Umwandlung von Reflexintensitäten in Strukturfaktoramplituden $|F_K(h\ k\ l)|$ erfolgte mit dem CCP4-Programm TRUNCATE (French & Wilson, 1978) in den Versionen 3.0, 3.3 und

3.4.

Für den Vergleich verschiedener Datensätze wurde SCALEIT 3.4 (CCP4, 1994) eingesetzt. Außerdem wurde eine gleichbleibende Gruppe von 5 % zufällig ausgewählten Reflexen für die Berechnung des freien R-Werts bei allen Datensätzen verwendet.

III.5 Selbstrotationssuche

Die Suche nach der Lage der zweizähligen Achse von *T. cruzi*-TAT erfolgte im Polarkoordinatensystem mit der Locked-Rotation-Funktion in REPLACE (Tong & Rossmann, 1990). Um ein möglichst deutliches Signal zu erhalten, mußte die Berechnung für jeden Datensatz hinsichtlich des Patterson-Integrationsradius und der verwendeten Auflösung optimiert werden.

III.6 Molekularer Ersatz

Anhand der Eigenschaften von *T. cruzi*-Tyrosinaminotransferase (katalysierte Reaktion, Kofaktor, Aminosäuresequenz, Molekulargewicht) wurden aus der PDB-Strukturdatenbank alle Einträge ausgewählt, die für einen Molekularen Ersatz in Frage kommen konnten. Die Temperaturfaktoren wurden auf 20 \AA^2 zurückgesetzt und die Aminosäureseitenketten bei einigen Rechnungen in Alanine umgewandelt. Nur dimere Moleküle kamen zum Einsatz.

Die Orientierungs- und Positionssuche erfolgten mit dem Programm AMORE 3.0 und 3.4 (Navaza, 1994), wobei sowohl konventionelle $|F_K(h\ k\ l)|$ als auch normierte Strukturfaktoramplituden $|E_K(h\ k\ l)|$ verwendet wurden. Eine Parameteroptimierung (Pattersonradius, Auflösungsbereich) erfolgte nur mit den Strukturmodellen, die sich in ersten Rechnungen als erfolgversprechend erwiesen hatten.

Ferner wurden Tests mit der Pattersonkorrelation, die das Signal in der Rotationsfunktion durch verbesserte Anordnung von Faltungsdomänen zu verstärken versucht (Brünger, 1990a), durchgeführt.

Zur Identifizierung der korrekten Lösung mußten neben den Funktionswerten aus AMORE auch der Vergleich mit der Selbstrotationsfunktion (Kapitel III.5) und eine Kristallpackungsinspektion herangezogen werden. Letztere erfolgte mit dem Grafikprogramm O (Jones *et al.*, 1991).

III.7 Schwermetallpositionssuche

Mit dem Programm SCALEIT wurden Nativ- und Derivatmessung gegeneinander skaliert. Die Berechnung einer Differenzpattersonkarte erfolgte mit der Fast-Fourier-Routine FFT 3.4 (Ten Eyck, 1973) aus CCP4. Aus dieser Karte wurden mit RSPS 3.2.2 (CCP4, 1994) mögliche Schwermetallpositionen bestimmt, die dann im Programm MLPHARE (Otwinowski, 1991) mit der Maximum-Likelihood-Methode verfeinert und zur Berechnung von Phasen für den nativen Datensatz eingesetzt wurden.

III.8 Sequenzvergleiche

Die Qualität der Elektronendichtekarten zu Beginn der Verfeinerung reicht im allgemeinen nicht für eine sichere Identifizierung von Aminosäureseitenketten aus. Deshalb ist es für die Strukturverfeinerung mit der Methode des Molekularen Ersatzes notwendig, daß zuverlässige Sequenzgegenüberstellungen (Alignments) von Such- bzw. Startmodell und Primärstruktur des untersuchten Proteins zur Verfügung stehen.

Alle selbst angefertigten Sequenzvergleiche wurden nach dem Algorithmus von Needleman und Wunsch (Needleman & Wunsch, 1970) berechnet. Dabei wurde mit den auf Sequenzdaten beruhenden BLOSUM-Matrizes (Henikoff & Henikoff, 1992) und mit der STRUCGAP-Matrix (Risler *et. al.*, 1988), die auf der statistischen Auswertung von Substitutionshäufigkeiten in verwandten Proteinstrukturen basiert, in GCG 9.1 gearbeitet. Außerdem wurde das Programm CLUSTAL W (Thompson, 1994) verwendet.

Der Vergleich von Sequenzen mit einer Identität von mehr als 30% ist meistens unproblematisch. Sobald die Ähnlichkeit zwischen den Proteinen jedoch geringer ist, wird das Einfügen von Insertionen bzw. Deletionen normalerweise zu hoch gewichtet, so daß der Computer die Ähnlichkeit zweier Sequenzen nicht mehr erkennt. Wird auf der anderen Seite das Lückengewicht sehr niedrig gewählt, zerfällt das Alignment in viele Bruchstücke, die z.B. wegen des Auftretens einer Insertion inmitten einer α -Helix unrealistisch sind.

Eine verbesserte Behandlung von Sequenzen mit geringer Homologie wird erreicht, wenn mehr als zwei verwandte Proteine miteinander verglichen werden. Diese sog. multiplen Alignments zeigen konservierte Aminosäurereste bei geeigneter Parameterauswahl besser auf, so daß für die Strukturrekonstruktion zuverlässigere Ankerpunkte in der Elektronendichte zur Verfügung stehen. Ferner besteht im Programm CLUSTAL W die Möglichkeit, positionsabhängige Austauschmatrizes einzusetzen, die die Schaffung einer Deletion im Zentrum eines Sekundärstrukturelements höher gewichten als innerhalb einer flexiblen Schleife. Auch dadurch werden genauere Alignments erstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich publizierte Sequenzgegenüberstellungen von Aminotransferasen aus dem Internet (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00155>) und aus der Literatur (Mehta *et al.*, 1993) verwendet. Letzteres berücksichtigt ein spezifisches Sequenzprofil für diese Enzyme.

III.9 Verfeinerung

Die *T. cruzi*-TAT-Struktur wurde aus den Koordinaten der kompletten *E. coli*-Aspartat-Aminotransferase in der geschlossenen Form (Okamoto *et al.*, 1994) konstruiert. Bis zur Identifizierung und dem Einbau aller Insertionen und Deletionen in das Modell wurde mit den Röntgenreflexen des Synchrotrondatensatzes 3 bis zu einer Auflösung von 3 Å unter Annahme von

striktter nichtkristallografischer Symmetrie gearbeitet. Zum Einsatz kamen die Verfeinerungsprotokolle von X-PLOR 3.851, wobei zunächst ein Solvensmodell erzeugt (Jiang & Brünger, 1994) und anschließend eine klassische Minimierung mit konjugierten Gradienten durchgeführt wurden. Das Gewicht des Röntgenterms wurde über den freien R-Wert bestimmt (Brünger, 1992). Hierauf folgten mehrere Moleküldynamikläufe mit dem klassischen Protokoll (Brünger *et al.*, 1990b) und mit der Torsionswinkel-moleküldynamik (Rice & Brünger, 1994) bei verschiedenen Temperaturen und mit verschiedener Gewichtung der Röntgendaten gegenüber den geometrischen Parametern. Die Beschreibung der Molekülstruktur mit Torsionswinkeln führt zu einer starken Erniedrigung der Parameterzahl und kann daher gerade bei geringerer Auflösung der eingesetzten Röntgendaten bessere Verfeinerungsergebnisse liefern. Für den folgenden manuellen Verfeinerungszyklus wurde immer die Struktur mit dem besten freien R-Wert ausgewählt.

Alle manuellen Eingriffe in die *T. cruzi*-TAT-Struktur erfolgten im Programm O 6.1.x und 6.2.x (Jones *et al.*, 1991). In den ersten Zyklen wurde vielfach die angeschlossene Strukturdatenbank des Programms zur Regularisierung von durch die MD-Simulation gestörten Sekundärstrukturelementen genutzt.

Vor jedem neuen Computerverfeinerungszyklus wurden Solvenskorrektur und Röntgentermgewicht erneut berechnet.

Nach der Vervollständigung der Proteinkette wurde der Kofaktor in die Verfeinerung miteinbezogen. PLP-Bindungs- und Torsionswinkelparameter für X-PLOR und REFMAC entstammten den Programmen XPLO2D 2.8.1 (Kleywegt & Jones, 1997) und MAKEDICT 3.4 (CCP4, 1994). Die Bindungslängen für die Schiff-Basenbindung wurden aus anderen Strukturen der PDB abgeleitet. Ladungen wurden nicht berücksichtigt.

Im Anschluß wurde die Auflösung in 0.1 Å-Schritten bis auf 2.5 Å erhöht und dann auch die Temperaturfaktoren in die Verfeinerung miteinbezogen. Die Beschränkung durch nichtkristallografische Symmetrie wurde dabei nach und nach aufgehoben.

Die letzten Korrekturen im *T. cruzi*-TAT-Strukturmodell erfolgten unter Verwendung der Maximum-Likelihood-Funktion im CCP4-Programm REFMAC 3.4 (Murshudov *et al.*, 1997) mit der Matrix CGMAT. Die geometrischen Restraints kamen dabei aus dem Programm PROTIN 3.4, und das Solvensmodell wurde in Form von Strukturfaktoramplituden und Phasen aus X-PLOR 3.851 geliefert. Dabei wurde eine Matrix zur anisotropen Skalierung von beobachteten und berechneten Strukturfaktoramplituden appliziert. Das Gewicht des Röntgenterms wurde manuell über die Optimierung des freien R-Werts ermittelt.

Aufgrund von Schwierigkeiten mit dem Synchrotron Datensatz I konnte die Endverfeinerung nur mit dem mit fünf Kristallen gemessenen Raumtemperatur Datensatz 1 abgeschlossen werden.

Schließlich wurde mit dem Programm ARPP 4.b (Lamzin & Wilson, 1993) nach gut definierten

Wassermolekülen gesucht. Pro Zyklus wurden 30 Atome addiert, wobei das Programm selbst die Stärke des Signals für ein Solvensmolekül in der Differenzelektronendichte festlegte. Als Abbruchkriterium diente wiederum das Minimum des freien R-Werts. Nach der erneuten Berechnung eines Lösungsmittelmodells in X-PLOR 3.851 wurde das nun vollständige Strukturmodell der *T. cruzi*-TAT mit REFMAC einer abschließenden Computeroptimierung unterzogen.

III.10 Elektronendichtekarten

Im Zuge der Verfeinerung kamen verschiedene Methoden zur Berechnung von Elektronendichtekarten zum Einsatz. Zu Beginn war die Phaseninformation noch so ungenau, daß Karten in der Art einer klassischen $(2|F_{obs}| - |F_{calc}|; \Phi_{calc})$ -Elektronendichte in viele Bruchstücke zerfielen und sich somit die Proteinkette in ihnen nicht verfolgen ließ. Aus diesem Grund wurde zunächst mit $(|F_{obs}|; \Phi_{calc}; w_{calc})$ -Karten gearbeitet, wobei w_{calc} ein Gewichtungsfaktor für den jeweiligen Reflex ist. Zwar besitzen diese Karten durch die Dominanz der berechneten Phaseninformation eine starke Neigung zum Modell (engl. bias), ließen aber dennoch eine Identifizierung grob abweichender Strukturbereiche und Korrektur durch Entfernung aus dem Modell zu.

In späteren Stadien wurden in der Hauptsache σ_A -gewichtete Karten verwendet (Read, 1986). Das Verfahren ersetzt den Ausdruck $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$ durch einen berechneten Fourierkoeffizienten, der Fehler in der zur Bestimmung von Phasen herangezogenen Struktur, also des momentanen Strukturmodells, berücksichtigt und so den Modelleinfluß heruntersetzt, um bisher nicht im Modell enthaltene Details der neuen Struktur erkennbar werden zu lassen. Auch die eingesetzten Differenzfourierkarten wurden mit diesem Verfahren erstellt.

Weitere Information konnte durch den Einsatz sog. Omit-Karten gewonnen werden (Vellieux & Dijkstra, 1997). Bei diesen wird entweder ein kleiner Teil des Modells zur Berechnung der Phasen entfernt, oder es wird systematisch die gesamte asymmetrische Einheit in Teile zerlegt, die dann nacheinander zur Berechnung der Elektronendichte in ihnen ausgeschlossen werden (Bhat, 1988). Ziel der Prozedur ist es, den Modelleinfluß bei der Elektronendichteberechnung an der ausgeschlossenen Position zu unterdrücken. Wenn die ursprüngliche Elektronendichte von selbst wieder in der Karte erscheint, ist das Strukturmodell an dieser Stelle korrekt. Eine Erweiterung des Konzepts besteht darin, einen Teil des Modells aus der Rechnung auszuschließen und anschließend eine kurze Moleküldynamikrechnung durchzuführen, um die "Phasenerinnerung" der Gesamtstruktur an die untersuchte Position zu löschen. Solche Rechnungen wurden in X-PLOR 3.851 durchgeführt (Hodel *et al.*, 1992).

III.11 Dichtemodifikation

Die Elektronendichtemodifikationen wurden mit dem CCP4-Programm DM 3.4 (Cowtan, 1994) durchgeführt. Das Programm vollzieht eine Solvenskorrektur nach der iterativen Wang-Methode (Wang, 1985) und paßt das Histogramm der Elektronendichtewerte an eine Standardverteilung an (Zhang & Main, 1990). Außerdem führt es im reziproken Raum mit einer vorher durch das Programm NCSMASK 3.4 (CCP4, 1994) erzeugten und optimierten Monomermaske eine Dichtemittelung über die nichtkristallografischen Symmetrieeoperatoren durch (Schuller, 1996). Dabei kann der Operator durch das Programm verbessert werden. Ferner besteht die Möglichkeit der Elektronendichteskeletonisierung (Baker *et al.*, 1993; Swanson, 1994). Als Konvergenzkriterium verwendet das Programm nicht den über die Strukturfaktoramplituden berechneten freien R-Wert, sondern schließt einen Teil der Elektronendichte in der Protein- und der Solvensregion während der Modifikationen aus. In diesen Bereichen, die für jeden Programmzyklus wieder zufällig ausgewählt werden, wird die Verbesserung der Korrelation gesondert in Form eines freien R-Werts im realen Raum beobachtet.

Neben dem Programm DM kam auch die RAVE-Software zum Einsatz (Kleywegt & Jones, 1994). Nach der Erzeugung einer Monomerenmaske mit MAMA 5.2 und Optimierung des nichtkristallografischen Symmetrieeoperators mit IMP 2.0 führt das Programm AVE 4.0.1 eine Dichtemittelung im realen Raum durch. Ein komplettes Verfeinerungsschema zeigt Abb. III.4.

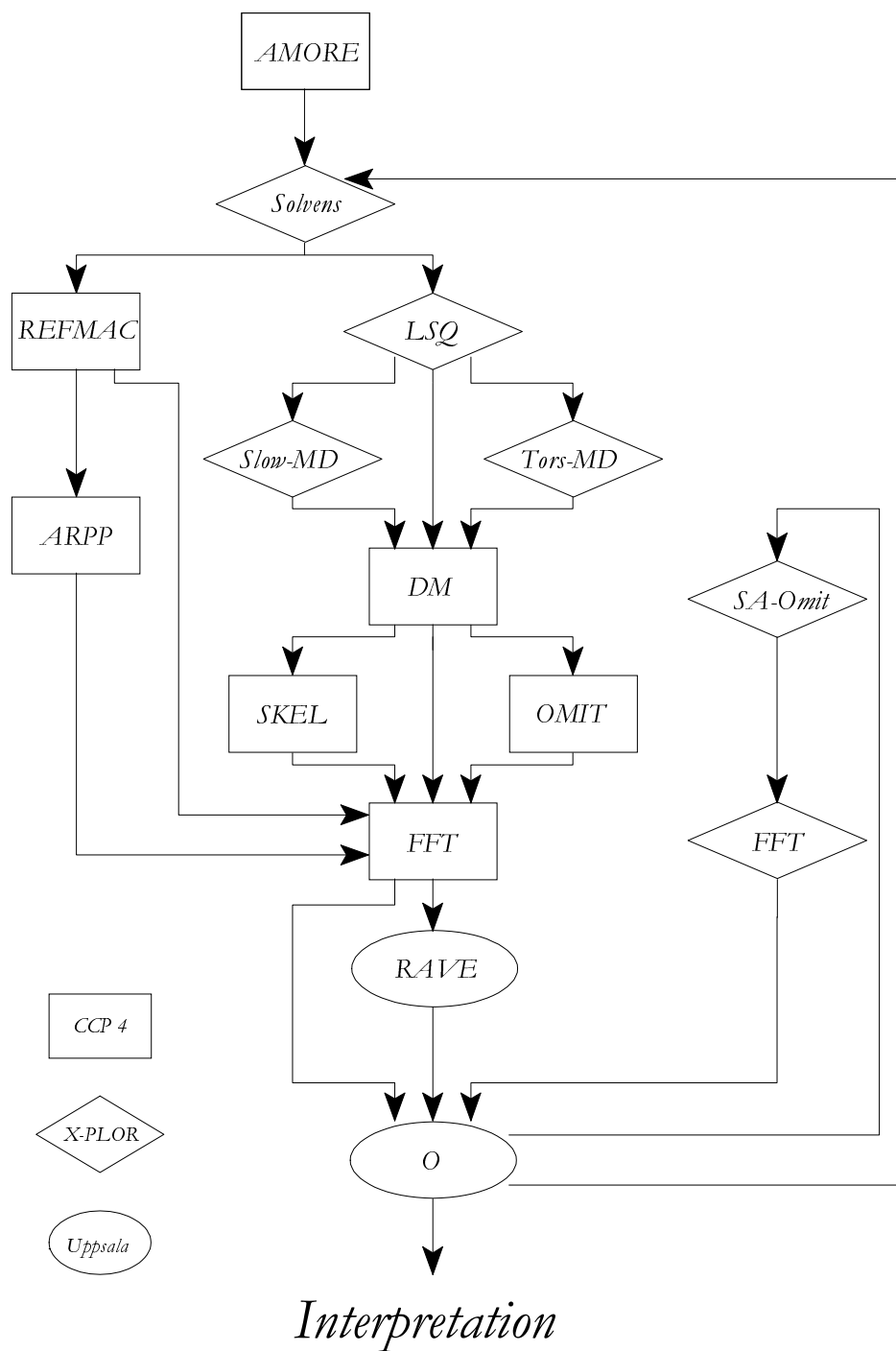


Abb. III. 4: Verfeinerungsstrategie für *T. cruzi*-TAT. Die Rahmenform gibt Aufschluß über die Herkunft des Computerprogramms

III.12 Substratdocking

Da alle Ansätze, kristallografische Daten für einen Protein-Substrat-Komplex zu gewinnen, fehlschlagen, wurde versucht, auf theoretischer Basis einen Einblick in den Substratbindungsmodus der *T. cruzi*-TAT zu erhalten. Hierfür wurde das Programm AUTODOCK 2.4 (Morris *et al.*, 1996) verwendet. Dieses sucht nach der besten Bindungsstelle eines Liganden in einem vordefinierten Proteinbereich wie z.B. dem aktiven Zentrum eines Enzyms. Dabei werden auch die Torsionswinkel des Substrates optimiert.

Das Programm erstellt zunächst für jeden im Liganden vorkommenden Atomtyp eine Energietabelle, indem das Atom durch ein Gitter über den zu untersuchenden Anlagerungsbereich bewegt und an jeder Position seine Energie anhand eines Lennard-Jones-Potentials errechnet wird. Außerdem wird eine Tabelle für elektrostatische Wechselwirkungen erzeugt.

Der Ligand wird im Bereich der Bindungsstelle zufällig bewegt und seine Torsionswinkel werden verändert. Bei jedem Schritt wird seine Energie anhand der Tabellen berechnet. Wenn sie niedriger ist, wird die neue Position akzeptiert. Falls sie um ΔE höher ist, werden die neuen Koordinaten anhand der Wahrscheinlichkeit $P(\Delta E)$

$$P(\Delta E) = e^{-\frac{\Delta E}{k_B \cdot T}} \quad (\text{III.2})$$

angenommen oder nicht, wobei T eine Temperatur und k_B die Boltzmann-Konstante ist (Monte-Carlo Simulated Annealing). Bei hohen Temperaturen werden praktisch alle Schritte angenommen. Ähnlich der Strukturverfeinerung mit Hilfe von Moleküldynamik wird die Temperatur im Laufe der Rechnung gesenkt. Außerdem werden auch hier mehrere Läufe durchgeführt, weil der Verlauf der Rechnung von den zufällig gewählten Anfangsparametern abhängig ist.

Zunächst wurden die Solvensmoleküle aus der *T. cruzi*-TAT-Struktur entfernt und dann alle polaren Wasserstoffatome erzeugt. Diesem Modell wurden anhand eines modifizierten PARSE-Datensatzes (Sitkoff *et al.*, 1994) in GRASP (Nichols *et al.*, 1991) Ladungen zugewiesen. Für alle Atome des Kofaktors wurden formelle Ladungen erstellt, wobei eine zweifach negative Ladung der Phosphatgruppe und eine unprotonierte Schiff'sche Basenbindung angenommen wurden. Die Berechnung der Ladungen von Substratmolekülen erfolgte in HYPERCHEM 2 mit der semiempirischen Orbitalmethode MINDO/3 (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap, Version 3; Baird & Dewar, 1969).

Für jedes Molekül wurden 100 Läufe durchgeführt. Die Starttemperatur betrug 1500 K und pro Temperaturstufe wurden 3000 akzeptierte und 3000 abgelehnte Schritte vollzogen. Die Inspektion des Rechnungsergebnisses erfolgte in O (Jones *et al.*, 1991).

III.13 Erstellung eines Strukturmodells von humaner TAT

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit der beiden Proteine ist es möglich, ein Modell der humanen Tyrosin-Aminotransferase aus der Struktur des *T. cruzi*-Enzyms zu erzeugen. In BRAGI (Schomburg & Reichelt, 1988) wurden dafür zuerst anhand eines Sequenzalignments alle Aminosäureaustausche in einem Monomer der *T. cruzi*-TAT-Struktur vorgenommen und dann mit Hilfe des DEAD-END-Theorems plausible Rotamere für die nicht konservierten Reste erzeugt. Das komplette Dimer wurde anhand des nichtkristallografischen Symmetrieoperators von *T. cruzi*-TAT generiert. Dieses Modell wurde in O an Stellen, an denen sich Gruppen sehr nahe kamen, manuell nachgearbeitet.

III.14 Bilder

Darstellungen von Molekülen wurden mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und BOBSCRIPT (Esnouf, 1998) vorbereitet, Oberflächen entstammen dem Programm GRASP (Nichols *et al.*, 1991). Nach Kombination und Optimierung in GL_RENDER (L. Esser & J. Deisenhofer, unveröffentlicht) erfolgte die endgültige Aufbereitung mit Pov-RAY™.

Die grafische Darstellung von Sequenzalignments erfolgte mit dem Programm ESPript (Gouet *et al.*, 1999).

IV. Ergebnisse und Diskussion

IV.1 Experimenteller Teil

IV.1.a Proteinanalytik

Die Aminosäureanalyse ergab für alle in der Kristallisation eingesetzten Proteinchargen eine Konzentration zwischen 1.8 und 3.2 mg/ml. Höhere Konzentrationen ließen sich aufgrund der Präzipitationsneigung des Proteins nicht realisieren. Die bei der Konzentrationsbestimmung ermittelte Aminosäurezusammensetzung stimmte mit dem nach der Sequenz zu erwartenden Wert überein. Die hohe Reinheit wurde zudem in der denaturierenden SDS-Gelelektrophorese bestätigt.

Da sich der N-Terminus des Proteins als modifiziert erwies, war eine Ansequenzierung nicht möglich. Dieses Verhalten war bereits aus der Literatur bekannt (Montemartini *et al.*, 1993).

Das mit MALDI-TOF-MS bestimmte Molekulargewicht von *T. cruzi*-TAT in Lösung entsprach dem nach der Sequenz erwarteten Wert von 46167 Da, wobei die überschüssige Masse von ca. 40 Da durch die N-terminale Blockierung erklärbar ist (Abb. IV.1a), z.B. in Form einer Acetylierung wie bei humaner TAT (Hargrove *et al.*, 1989).

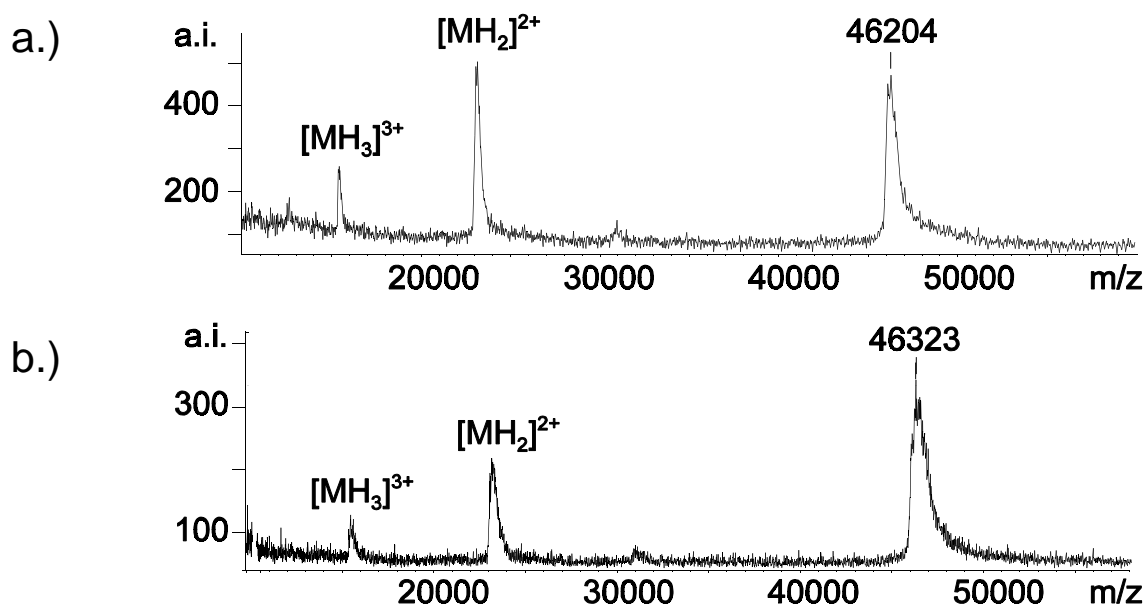


Abb. IV. 1: MALDI-Spektren von a.) gelöster und b.) kristalliner *T. cruzi*-TAT

In allen untersuchten Proteinchargen lieferte das MALDI-Spektrum anhand der Peakbreite Hinweise auf geringfügige Heterogenität.

Zur Bestimmung der Masse von kristalliner TAT wurde ein Kristall auf dem MALDI-Proben-träger mit Sinapinsäurelösung versetzt (Abb. IV.1b). Die Ursache für das leicht erhöhte Molekulargewicht ist nicht klar, könnte aber in der Oxidation von Cysteinen bei dem einige Monate alten Kristall begründet sein. Das Spektrum beweist, daß bei der Kristallisation keine proteolytische Modifikationen der Proteinkette stattfindet.

IV.1.b Nachreinigung

Einige der aus Argentinien stammenden Proteinchargen ließen sich nur schlecht und unreproduzierbar kristallisieren. Mit nativer Gelelektrophorese und Dynamischer Lichtstreuung konnte nachgewiesen werden, daß in diesen Lösungen ein Teil des Proteins aggregiert war. Das Molekulargewicht der Hauptverunreinigung auf dem nichtdenaturierenden Gel entsprach dabei etwa dem eines *T. cruzi*-TAT-Tetramers. Die Aneinanderlagerung schien nicht über intermolekulare Disulfidbrücken erfolgt zu sein, denn die Zugabe von reduzierenden Reagenzien trennte die Aggregate nicht. Für diese Proteinlösungen wurde zur Nachreinigung eine Gelfiltration auf Superdex-200 eingesetzt. Hiermit konnte aggregiertes Proteinmaterial entfernt werden. Ein exemplarisches Chromatogramm mit dazugehörigem Nativgel ist in Abb. IV.2 gezeigt.

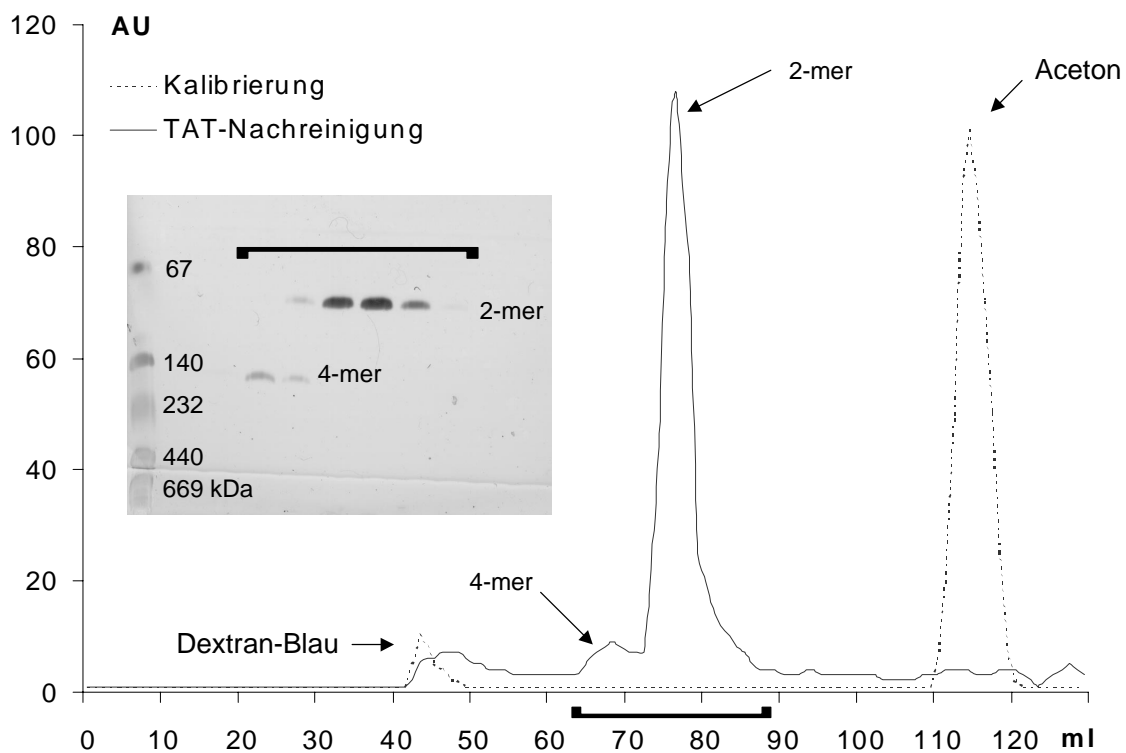


Abb. IV. 2: Nachreinigung von teilaggregierter *T. cruzi*-TAT. Der Trennbereich der Säule wurde mit Dextran-Blau und Aceton bestimmt.

Die Dynamische Lichtstreuung des so gereinigten Materials ließ sich monomodal auswerten und lieferte ein Molekulargewicht von 67 kDa (vor der Reinigung: ≥ 200 kDa). Dabei kann die Abweichung von den für *T. cruzi*-TAT erwarteten 90 kDa mit der nicht kugelförmigen Gestalt der Aminotransferase erklärt werden.

IV.1.c Kristallisation

Schon nach den ersten Tests zeigte sich, daß Polyethylenglykole (PEGs) für die Kristallisation des Enzyms geeignet sind, während Salze als Fällungsmittel nicht erfolgversprechend waren. Der pH-Bereich konnte zunächst auf den Wert zwischen 6.5 und 8.5 eingegrenzt werden.

Diese initialen Bedingungen wurden bzgl. der Art und der Konzentration des PEG's sowie des pH-Wertes der Lösung optimiert. Von den getesteten Präzipitanden lieferte PEG 8000 in einer Konzentration von 21 % (w/w) mit 0.1 M Zitronensäure/ K_2PO_4 -Puffer, pH 6.7 - 6.9 die besten Ergebnisse, wobei jedoch oft nur nadelförmige oder sogar gar keine Kristalle entstanden. Der Zusatz von 1 % β -Octylglucopyranosid, der bei schlechtlöslichen Proteinen die hydrophoben Oberflächenbereiche bedecken und so vor einer amorphen Präzipitation schützen soll, übte keinen positiven Einfluß auf die *T. cruzi*-TAT-Kristallisation aus.

Die erhaltenen Kristalle lösten sich beim Montieren für die Diffraktionsmessung auf. Dieser Eigenschaft konnte entgegengetreten werden, indem die Kristallisation nicht bei 19° C, sondern 12° C durchgeführt wurde.

In Macroseeding-Tests ließen sich kleine Kristalle zwar vergrößern, wurden dabei aber so verwachsen, daß sie für das Röntgenexperiment ebenfalls ungeeignet waren.

Durch den Zusatz von mit dem Protein assoziierten Molekülen kann das Kristallisationsverhalten oft verbessert werden, weil die Struktur durch die feste Bindung eines kleinen Moleküls starrer wird und so durch die engere Begrenzung des Konformationsraumes eine homogenere Strukturpopulation für die Kristallbildung zur Verfügung steht. Zur Vermeidung von nadelförmigen *T. cruzi*-TAT-Kristallen und für eine bessere Reproduzierbarkeit erwies sich der Zusatz von 2 μ l 5 mM Pyridoxal-5'-Phosphatlösung als förderlich. Die Addition verschiedener Inhibitoren oder Substrate hatte keinen positiven Einfluß auf die Kristallisation unter den gefundenen Bedingungen. Offenbar handelt es sich bei dem kristallisierten Protein um die offene Konformation der Aminotransferase. Für eine durch Substrat- bzw. Inhibitorbindung geschlossene Struktur müßte nach neuen Präzipitationsbedingungen mit einer möglicherweise abweichenden Kristallform gesucht werden.

Mit der verbesserten Fällungsmittelzusammensetzung (s. Tabelle VI.1) entstanden wenige Kristalle mit ausreichender Qualität. Diese waren jedoch bei Raumtemperatur im Röntgenstrahl nicht sehr stabil, so daß pro Kristall nur ein kleiner Teil eines vollständigen Datensatzes aufgenommen werden konnte. Außerdem waren die Bedingungen, unter denen die Kristalle ent-

standen, nicht sehr scharf definiert, weshalb ein gewisser Grad an Nichtisomorphie zwischen verschiedenen Kristallen zu erwarten war. Es wurde daher mittels Mikrodialyse versucht, größere Kristallmengen mit identischen Eigenschaften zu erzeugen. Der mit den Experimenten im sitzenden Tropfen ermittelte pH-Wert erwies sich dabei als nicht übertragbar. Mit einer sehr kleinen pH-Elektrode wurde deshalb der Wert in einem Kristallisationstropfen gemessen und dann auf die Mikrodialyse übertragen. Pro Ansatz konnten so mehrere isomorphe Kristalle für die Messung eines Raumtemperaturdatensatzes gewonnen werden.

Methode	Präzipitand	Puffer	pH	T	Additiv
Dampfdiffusion 4 µl TAT 2 µl Präzipitand	PEG 8000 22 - 24 % (w/w)	Citrat/Phosphat 0.1 M	6.3 - 6.6	12 °C	5 mM PLP 2 µl
Dampfdiffusion 4 µl TAT 2 µl Präzipitand	PEG 4000 25 - 27 % (w/w)	Citrat/Phosphat 0.1 M	6.6 - 6.9	12 °C	5 mM PLP 2 µl
Mikrodialyse	PEG 8000 25 % (w/w)	Citrat/Phosphat 0.1 M	7.0	12 °C	5 mM PLP

Tab. IV.1: Optimierte *T. cruzi*-TAT-Kristallisationsbedingungen

Abb. IV.3 zeigt die Fotografie von *T. cruzi*-TAT-Kristallen im sitzenden Tropfen.

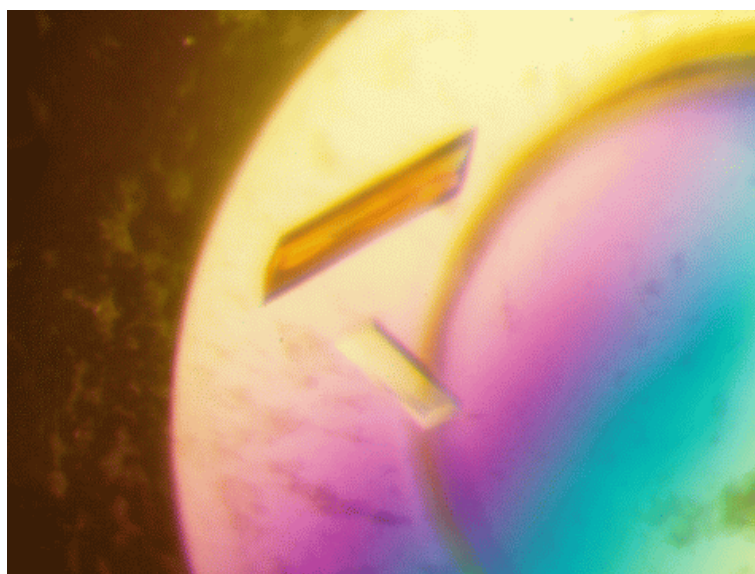


Abb. IV. 3: *T. cruzi*-TAT-Kristalle im sitzenden Tropfen

Die ermittelten Konditionen lieferten in der Regel nach etwa 2 Wochen ausgewachsene Kristalle. Allerdings waren sie mit später erhaltenen Proteinchargen nicht mehr reproduzierbar. Mit diesen konnten nur noch selten Kristalle gewonnen werden, wobei die Kristallisation teilweise mehrere Monate in Anspruch nahm. Auch die Nachreinigung (s. Kapitel IV.1.b) verbesserte die Kristallisationseigenschaften dieser Proteinlösungen nicht. Mit neuen Sparse Matrix Screens ließ sich ebenfalls kein Hinweis auf veränderte Fällungsmittelzusammensetzungen gewinnen.

IV.1.d Röntgenmessungen

Der erste *T. cruzi*-TAT-Röntgendatensatz wurde bei 12°C an der Drehanode mit fünf aus der Mikrodialyse stammenden Kristallen aufgenommen. Diese Vielzahl von Kristallen war notwendig, weil die TAT-Kristalle dem Röntgenstrahl zum einen nicht lange standhielten und ihre Raumgruppe zum anderen nur eine niedrige Symmetrie aufweist, so daß für einen vollständigen Datensatz viele Oszillationsbilder aufgenommen werden mußten.

Später wurde sowohl am Vierkreisdiffraktometer als auch an der Synchrotronbeamline eine Tieftemperaturvorrichtung zum Kühlen der Kristalle in verdampfendem Flüssigstickstoff installiert, so daß alle weiteren Datensätze mit nur einem einzigen Kristall gemessen werden konnten. Die Kristalle für diese Messungen stammten alle aus sitzenden Tropfen mit PEG 4000. Als bestgeeignetes Frostschutzmittel erwies sich dabei 15 % (v/v) Glycerin, 30% (w/v) PEG 4000, 0.1 M Citrat/Phosphatpuffer (pH 7.4).

Alle Kristalle gehörten zur Raumgruppe $P 2_1$ mit einem Dimer pro asymmetrischer Einheit. Die Gitterkonstanten waren in allen Datensätzen ähnlich. Trotzdem lieferte ein Vergleich mit dem CCP4-Programm SCALEIT einen Grad an Nichtisomorphie, der ein Zusammenführen der Datensätze nicht gerechtfertigt erscheinen ließ. Die *T. cruzi*-TAT-Struktur wurde mit den Zellachsen $a = 61.6$, $b = 102.2$, $c = 77.9$ Å und einem monoklinen Winkel von $\beta = 110.3^\circ$ endverfeinert (Datensatz 3). Der Matthews-Parameter V_m betrug $2.5 \text{ Å}^3/\text{Da}$.

Eine Übersicht über die wichtigsten Charakteristika der gemessenen Datensätze gibt Tabelle IV.2.

Nr.	T / K	λ / Å	Auflösung / Å	R-merge / %	Reflexe	Vollständigkeit / %	Redundanz	$\langle I / \sigma(I) \rangle$	B / Å ²	Zusatz
1	285	1.54	10 - 2.5	5.1 9.6 (2.64 - 2.5 Å)	24668	78.4 47.0 (2.65 - 2.5 Å)	1.7	17.0 6.0 (2.61 - 2.5 Å)	30.2	-
2	135	1.54	15.8 - 2.56	5.9 11.3 (2.64 - 2.5 Å)	21881	77.9 32.6 (2.7 - 2.56 Å)	1.8	10.9 4.0 (2.7 - 2.56 Å)	35.2	-
3	100	1.1	16.4 - 2.3	8.8 16.8 (2.4 - 2.3 Å)	37644	95.3 91.3 (2.4 - 2.3 Å)	2.2	13.6 7.2 (2.49 - 2.3 Å)	35.7	-
4	100	1.1	18.3 - 2.4	4.5 9.6 (2.54-2.4 Å)	25266	75.7 67.4 (2.54 - 2.4 Å)	2.1	14.0 9.1 (2.6 - 2.4 Å)	32.3	Methyltyrosin
5	100	1.07	18.1 - 2.5	7.4 25.2 (2.64 - 2.5 Å)	29857	98.3 95.0 (2.64 - 2.5 Å)	3.0	17.7 4.9 (2.71 - 2.5 Å)	49.9	Methylmethionin
6	100	1.0	19.9 - 2.8	8.3 13.8 (2.95 - 2.8 Å)	19978	96.7 90.5 (2.95 - 2.8 Å)	2.9	11.7 7.0 (3.01 - 2.8 Å)	39.2	-
7	100	1.1	18.3 - 2.7	6.1 8.8 (2.82 - 2.7 Å)	17117	69.6 68.5 (2.82 - 2.7 Å)	1.1	18.1 13.8 (2.89 - 2.7 Å)	40.6	Hg(II)-Chlorid

Tab. IV.2: *T. cruzi*-TAT-Röntgendatensätze. Wenn zwei Zahlen in einem Feld aufgeführt sind, bezieht sich die untere Angabe auf den in Klammern gegebenen höchsten Auflösungsbereich.

IV.1.e Selbstrotationssuche

Die Lage der beiden zweizähligen nichtkristallografischen Achsen in der $P 2_1$ -Elementarzelle konnte in allen Datensätzen bestimmt werden. Das deutlichste Signal lieferte dabei Datensatz 3, der offenbar in dem für die Selbstrotationssuche verwendeten Bereich ($10 - 3 \text{ \AA}$; Radius 42 \AA) das stärkste Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist (Abb. IV.4a).

In den Datensätzen Nr. 6 und 7 wurde eine Zellaufstellung gefunden, die auf eine Inversion der a -Achse hindeutet (Abb. IV.4b).

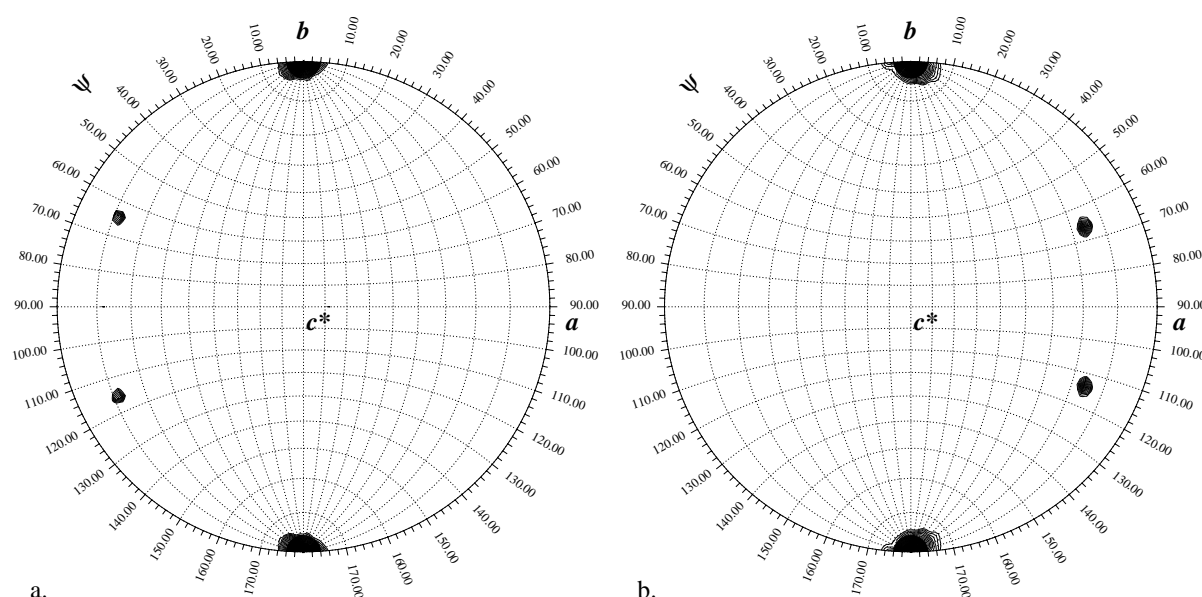


Abb. IV. 4: a.) κ -180°-Selbstrotation, Datensatz 3; b.) κ -180°-Selbstrotation, Datensatz 6

Nach der zur Inversion der a -Achse gehörenden Umindizierung von $(h \ k \ l)$ zu $(h \ -k \ -l)$ geht die Selbstrotationsfunktion in Abb. IV.4b in die der übrigen Datensätze über. Allerdings verändert dabei auch der monokline Winkel seinen ursprünglichen Wert β zu $(180^\circ - \beta)$, so daß daraus eine spitzwinklige Elementarzelle resultiert, die aufgrund der Konvention, daß β größer als 90° sein muß, mit der durch die ac -Ebene verlaufenden Achse c' und dem monoklinen Winkel β' indiziert wird. Da im Falle der *T. cruzi*-TAT-Kristalle der monokline Winkel nahe bei 120° liegt, besitzen c und c' ähnliche Längen (Abb. IV.5). Durch eine geringfügig veränderte Anordnung der Moleküle im Kristall kann deshalb bei der Datenindizierung die eine oder andere c -Achse ausgewählt werden, obwohl die Kristallpackungen sehr ähnlich sind. Aufgrund der Konvention für den monoklinen Winkel besitzen die a -Zellkanten in den alternativen Zellaufstellungen unterschiedliche Vorzeichen, so daß für den direkten Vergleich zuerst eine Inversion notwendig ist.

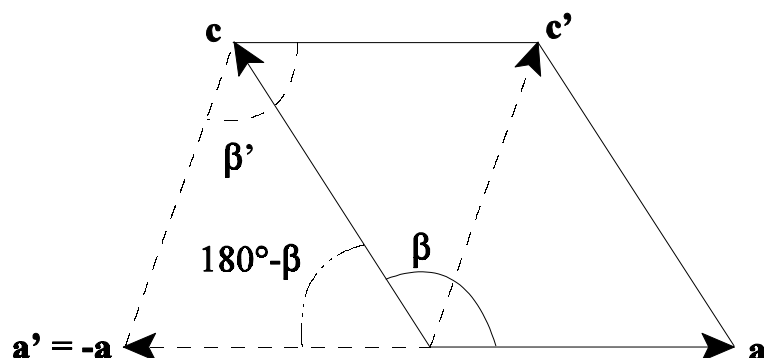


Abb. IV. 5: Zur unterschiedlichen Indizierung der Datensätze. Die gemeinsame Schraubenachse verläuft senkrecht zur Papierebene

IV.1.f Molekularer Ersatz

Von den zu Beginn des Projektes bekannten 49 Aminotransferasestrukturen der Protein Data Bank erwies sich nur die geschlossene Konformation der *E. coli*-Aspartataminotransferase (PDB-Code 1art; Okamoto *et al.*, 1994) als erfolgreiches Suchmodell für die Positionierung von *T. cruzi*-TAT in der P 2₁-Elementarzelle. 1art zeichnete sich dadurch aus, daß sich bei der Rotationssuche mit optimierten Parametern in AMORE eine Gruppe von vier gleichwertigen Orientierungswinkeln (dimeres Molekül und zweizählige Schraubenachse) abhob. Diese ließen die Selbstrotationsfunktion des Suchmodells, die nach Fouriertransformation der rotierten Struktur mit SFALL (CCP4, 1994) in REPLACE berechnet wurde, äquivalent zu der des experimentellen Datensatzes erscheinen.

Mit dem zuerst zur Verfügung stehenden Datensatz 1 (s. Tab. IV.2) war es nicht möglich, die korrekten Translationsparameter zu bestimmen. Keine der Lösungen hob sich deutlich vom Mittelwert der Translationsfunktion ab, und die zu den Maxima gehörenden Verschiebungsvektoren führten unter jeder der gewählten Parameterkombinationen zu Kristallpackungskonflikten. Auch die Pattersonkorrelationssuche in X-PLOR, für die die relative Anordnung von großer und kleiner Domäne des Suchmodells freigegeben wurde, konnte die Ausgangsstruktur nicht so verbessern, daß das Positionierungsproblem hätte gelöst werden können.

Da die Anwesenheit des Kofaktors im Suchmodell keinen Einfluß haben sollte, wurde er bei den Rechnungen nicht mit berücksichtigt. Versuche mit einem synthetischen Suchmodell, das aus den Koordinaten von 1art und der Sequenz von *T. cruzi*-TAT in BRAGI mit dem DEAD-END-Theorem erstellt wurde, lieferte keine Lösung für das Translationsproblem.

Erst Datensatz 2 unter Verwendung eines Polyalaninmodells, bei dem nur die offensichtlich

konservierten Reste des aktiven Zentrums nicht ausgetauscht waren, lieferte eine leicht herausgehobene AMORE-Translationslösung ohne Packungskonflikte. Für die Rechnung wurden hier normierte Strukturfaktoramplituden E , berechnet mit ECALC 3.4 aus dem CCP4-Programmpaket, eingesetzt.

Die Verfeinerung wurde zuerst mit dem in Datensatz 2 positionierten 1art-Polyalaninmodell begonnen. Kurze Zeit später konnten die Rotations- und Translationsparameter in Datensatz 3 bestätigt werden. Hier hob sich der korrekte Verschiebungsvektor, offenbar aufgrund der größeren Qualität der Messung im verwendeten Auflösungsbereich, noch deutlicher ab. Die ersten zehn Lösungen aus AMORE für diesen Datensatz sind in Tabelle IV.3 wiedergegeben. Als optimale Suchparameter erwiesen sich ein Pattersonradius von 42 Å mit 15 - 4 Å Auflösung für die Rotationssuche und 15 - 5 Å für Translationsfunktion und Starrkörperverfeinerung.

Nr.	α	β	γ	a	b	c	CC	R
1	206.44	100.67	175.98	0.2234	0.0000	0.0182	45.0	52.3
2	206.54	100.67	355.97	0.2234	0.0000	0.0183	45.0	52.3
3	333.48	79.33	175.98	0.2766	0.0000	0.4817	45.0	52.3
4	333.56	79.33	355.99	0.2766	0.0000	0.4818	45.0	52.3
5	185.97	118.80	349.36	0.0815	0.0000	0.2062	42.3	52.4
6	354.02	61.20	349.36	0.4185	0.0000	0.2938	42.3	52.4
7	186.05	120.02	168.69	0.2291	0.0000	0.1358	41.7	52.9
8	186.06	120.02	348.70	0.2291	0.0000	0.1357	41.7	52.9
9	353.94	59.98	168.70	0.2710	0.0000	0.3643	41.7	52.9
10	353.95	59.98	348.69	0.2709	0.0000	0.3643	41.7	52.9

Tab. IV.3: Positionssuche mit dem 1art-Polyalaninmodells in Datensatz 3. α , β und γ sind die Rotations- und a, b und c die Translationsparameter. CC ist der Korrelationskoeffizient, R der R-Wert der jeweiligen Lösung. Nur die ersten vier Lösungen sind korrekt.

IV.1.g Schwermetallpositionssuche

Durch die unterschiedliche Indizierung konnte die Schwermetallpositionssuche in Datensatz 7 nur im Vergleich zu Datensatz 6 durchgeführt werden. Allerdings war die Nichtisomorphie zwischen beiden Messungen nach SCALEIT mit einem R-Wert von 31.7 % bis 3.0 Å sehr hoch. Es war daher nicht möglich, die Position der Quecksilberatome mit einer Differenzpattersonfunktion zweifelsfrei zu bestimmen. Die vom Programm RSPS ermittelten und in MLPHARE verfeinerten Parameter lieferten bei der Kombination mit den Phasen des Modells aus dem Molekularen Ersatz keine Verbesserung der Elektronendichtekarten, die zur Vereinfachung der manuellen Verfeinerung hätte eingesetzt werden können. Datensatz 7 wurde daher nicht weiter

verwendet.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, die prinzipiellen Schwermetallbindungseigenschaften von *T. cruzi*-TAT mittels MALDI-MS zu ergründen. Dafür wurde etwas entsalzte Proteinlösung mit dem gleichen Volumen verschieden konzentrierter Schwermetallsalzlösungen versetzt, für zwei Stunden inkubiert und dann ein Massenspektrum aufgenommen (Abb. IV.6). Die Konzentration des Proteins lag bei etwa 1 mg/ml.

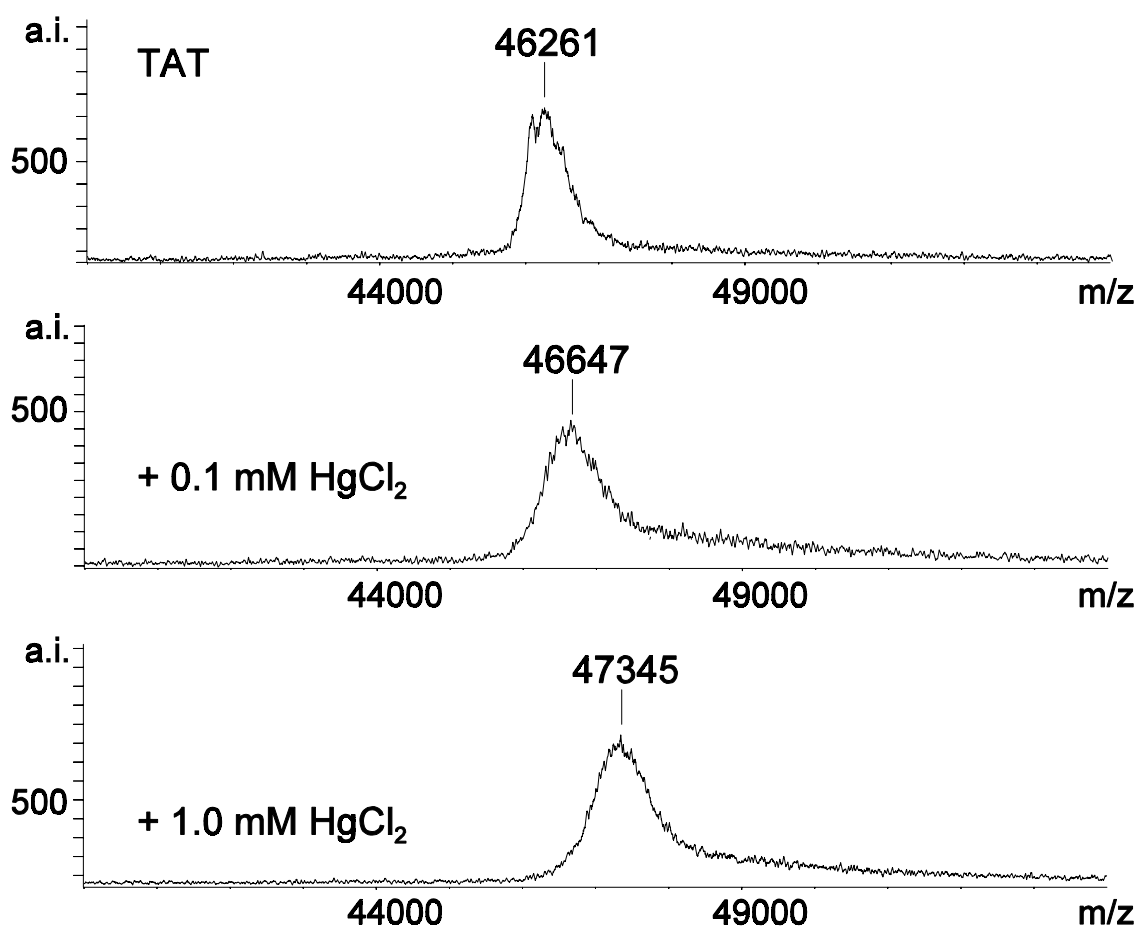


Abb. IV. 6: Bindung von Quecksilber(II)-Chlorid an gelöste *T. cruzi*-TAT. a.i.: arbitrary intensity

Demnach sind bereits bei einer Konzentration von 0.1 mM HgCl₂ zwei Quecksilberatome pro Monomer gebunden. Dieses Ergebnis könnte einen Hinweis auf die für Tränkungsexperimente nötige Schwermetallkonzentration liefern. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Kristallisation der *T. cruzi*-TAT konnte die Studie allerdings nicht auf Kristallebene fortgeführt werden.

IV.1.h Sequenzvergleiche

Für die Konstruktion eines *T. cruzi*-TAT-Modells aus der Struktur von *E. coli*-AsAT wurde ein möglichst eindeutiges Sequenzalignment benötigt. Allerdings besteht zwischen diesen beiden Proteinen nur eine geringe Sequenzidentität, so daß eine Gegenüberstellung mit herkömmlichen Vergleichsmatrizes unter Verwendung von Standardparametern im Programmpaket GCG nicht möglich ist.

Durch Herabsetzung der Strafwerte für Lückenerzeugung und -verlängerung sowie durch die Verwendung von multiplen Sequenzalignments war es mit den Alignmentprogrammen in GCG möglich, die konservierten Reste der Aminotransferasen-PLP-Bindungsstelle und zwei erhaltene cis-Proline in unmittelbarer Nähe zu reproduzieren. Allerdings konnten hierdurch keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden, da die Konservierung dieser Positionen schon vorher bekannt war. Außerdem entstanden viele Insertionen bzw. Deletionen innerhalb von Sekundärstrukturelementen, denn die GCG-Programme besitzen keine entsprechende Gewichtungsmöglichkeit. Mit dem Einsatz von CLUSTAL W, das eine Option zur Miteinbeziehung der Sekundärstruktur anbietet, konnten die Insertionen/Deletionen im zentralen Sequenzbereich zwar in Schleifenbereiche der Suchstruktur verschoben werden. Dennoch zeigten sich für N- und C-Terminus, die zusammen die substratbindende Domäne bilden, sowie für die Monomer/Monomer-Kontaktzone keine offensichtlichen Sequenzmotive, die als Ankerpunkte für die Verfeinerung hätten herangezogen werden können. Selbst das in allen Aminotransferasen konservierte Arginin, das die Carboxylatgruppe des Substrats bindet, konnte so nicht identifiziert werden. Die publizierten Alignments erwiesen sich hier als überlegen, hatten dafür aber in anderen Bereichen, wie etwa bei der Berücksichtigung von Sekundärstrukturelementen, Schwächen.

Da sich keine der Sequenzgegenüberstellungen als in allen Aspekten vollständig schlüssig erwies, wurden in jeder Phase der Verfeinerung mehrere Alignments verwendet.

IV.1.i Verfeinerung

Die Verfeinerung wurde mit Datensatz 2 begonnen und nach Messung von Datensatz 3 in diesem fortgeführt.

Um den Modelleinfluß möglichst gering zu halten und um Unabhängigkeit von den Sequenzgegenüberstellungen zu erreichen, wurde zuerst versucht, die Konstruktion der *T. cruzi*-TAT-Struktur mit dem Polyalaninmodell zu beginnen. Die korrekte Position der Sequenz sollte sich direkt aus der Elektronendichte ergeben. Diese Strategie erwies sich jedoch als falsch. Zwar konnten die Aminosäuren in Nähe der PLP-Bindungsstelle mit ziemlicher Sicherheit eingebaut werden. In den weiter entfernt gelegenen Bereichen ergaben sich jedoch zunächst nur wenig Ankerpunkte, von denen aus ein Sequenzaustausch möglich gewesen wäre. Ferner entstanden durch die fehlenden Seitenketten große Hohlräume im Innern des Proteins, so daß bei der

Computerverfeinerung mittels Moleküldynamik die Bewegungsfreiheit der Aminosäuren nicht stark genug eingeschränkt wurde und die geometrische Qualität des Modells mit zunehmender Zyklenzahl immer schlechter wurde.

Es war allerdings möglich, stark abweichende Strukturbereiche anhand fehlender Elektronendichte zu identifizieren und aus dem Strukturmodell zu entfernen. Außerdem konnten sinnvolle Hypothesen über den Sequenzverlauf aufgestellt werden, wie z.B. über die Verteilung von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren entlang von α -Helices.

Nach einigen Verfeinerungszyklen wurde die Geometrie der Proteinstruktur so schlecht, daß es sinnvoll erschien, mit einer veränderten Strategie erneut zu beginnen. Dafür wurde die komplette 1art-Struktur an die mit dem Polyalaninmodell gefundene Position aus AMORE gebracht. In den ersten Zyklen wurde nur die durch die Computerverfeinerung gestörte Sekundärstruktur regularisiert sowie Bereiche mit schlechter Elektronendichte aus dem Modell entfernt. Dadurch wurde erreicht, daß Sekundärstrukturelemente, die in *T. cruzi*-TAT zwar erhalten sind, aber eine andere relative Anordnung zum Rest des Proteins besitzen, langsam ihre neue Position finden konnten.

Zu jeder Zeit wurde mit mehreren Dichtekarten gearbeitet, und parallel zur manuellen Verfeinerung wurden neu modellierte Bereiche auf eine Verbesserung der R-Werte getestet.

Das Strukturmodell verbesserte sich zuerst nur sehr langsam. Nachdem aber im 14.ten manuellen Zyklus auf σ_A -gewichtete Karten umgestiegen werden konnte, fiel auf, daß sich aus der Elektronendichte an Monomer B wesentlich mehr neue Strukturdetails ableiten ließen als an Monomer A, das unter der Annahme strikter nichtkristallografischer Symmetrie bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich bearbeitet worden war. Durch den Wechsel gelang es in kurzer Zeit, die noch fehlenden Strukturbereiche in der substratbindenden Domäne und in der Monomer/Monomer-Kontaktfläche zweifelsfrei zu rekonstruieren. Dabei zeigte sich, daß im C-terminalen Bereich von *T. cruzi*-TAT zwei Insertionen von etwa 10 Aminosäuren Länge im Vergleich zu *E. coli*-AsAT auftreten, denen eine größere Deletion an einer Position etwa 50 Aminosäuren in Richtung N-Terminus gegenübersteht. Auch in anderen Abschnitten ergeben sich teilweise große Unterschiede zwischen den beiden Enzymen, die in keinem der verwendeten Sequenzalignments vorhergesagt wurden.

Nachdem der vollständige Kettenverlauf aufgeklärt worden war, ergaben sich bei der Auflösungsexpandierung und dem anschließenden Wechsel auf die Maximum-Likelihood-Verfeinerung im Programm REFMAC große Schwierigkeiten mit den Strukturfaktoramplituden aus Datensatz 3. Die Temperaturfaktoren stiegen größtenteils auf sehr hohe Werte, und die Elektronendichte wurde in einigen Oberflächenbereichen so brüchig, daß sich das Modell manuell nicht weiter verbessern ließ. Infolgedessen fielen die R-Werte nicht weiter ab. Möglicherweise ist die Röntgenaufnahme durch eine nichtoptimale Frostschutzmittellösung im höheren Auflö-

sungsbereich negativ beeinflusst worden, was auch der Grund für die hohen Mosaizitäten bei den Tieftemperaturmessungen sein könnte. Eine aufwendige Neuauswertung der Oszillationsaufnahmen brachte keine Verbesserung. Es wurde daher versucht, die Verfeinerung in einer der anderen Messungen bei erhöhter Auflösung zu beenden. Trotz der geringen Vollständigkeit erwies sich Datensatz 1 hier als vorteilhaft.

In den letzten Zyklen wurden nur noch kleine Änderungen an der Struktur vorgenommen. Die korrekte Modellierung von Aminosäuren mit ungewöhnlichen Hauptkettentorsionswinkeln wurde anhand von Simulated-Annealing-Omit-Karten überprüft. Mit den Programmen PRO-CHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und WHAT_CHECK (Hooft *et al.*, 1996) wurden zudem kleinere Fehler wie z.B. um 180° gedrehte Amidgruppen von Asparaginen detektiert und beseitigt. Eine starke Verbesserung der R-Werte wurde durch die Verwendung einer anisotropen Skalierung sowie durch die Übertragung des X-PLOR-Solvensmodells in REFMAC erzielt. Das Programm ARPP konnte 118 Wassermoleküle, die vorher deutlich in der Differenzfouriertransformation zu erkennen waren, zum Modell hinzufügen bevor sich der freie R-Wert nicht mehr verbesserte. Lediglich die drei N-terminalen Reste beider Monomere sowie die C-terminale Aminosäure von Monomer A wurden in der Elektronendichte nicht sichtbar. Beide Termini besitzen keine Wechselwirkungen mit dem Rest der Struktur, so daß diese Beobachtung nicht überrascht.

Einen Überblick über die wesentlichen Modellparameter gibt Tabelle IV.4. Der Ramachandran-Plot der endverfeinerten Struktur ist in Abb. IV.7 zu finden.

Auflösungsbereich (Å)	10.0 - 2.5
R / %	15.7
höchster Auflösungsbereich (2.6 - 2.5 Å)	21.1
R _{free} / %	21.4
höchster Auflösungsbereich (2.6 - 2.5 Å)	29.4
Anzahl	
Protein- und Kofaktoratome	6472
Wassermoleküle	118
Mittlerer Temperaturfaktor (Å ²)	
Protein- und Kofaktoratome, Kette A	26.1
Protein- und Kofaktoratome, Kette B	24.2
Wassermoleküle	25.0
Reste im Ramachandran-Kernbereich (%)	91
Mittlere NCS-Abweichung der C _α -Atome (Å)	0.513
Mittlerer Koordinatenfehler (Å)	0.312
Mittlere Bindungslängenabweichung (Å) (Ziel: 0.02)	0.006
Mittlere Winkelabweichung (Å) (Ziel: 0.04)	0.023
Mittlere Temperaturfaktorenabweichung benachbarter Atome (Å ²) (Ziel: 2.0)	0.721

Tab. IV.4: Parameter der in Datensatz 1 verfeinerten *T. cruzi*-TAT-Struktur. Der mittlere Koordinatenfehler wurde nach der Methode von Cruickshank (Cruickshank, 1998) berechnet.

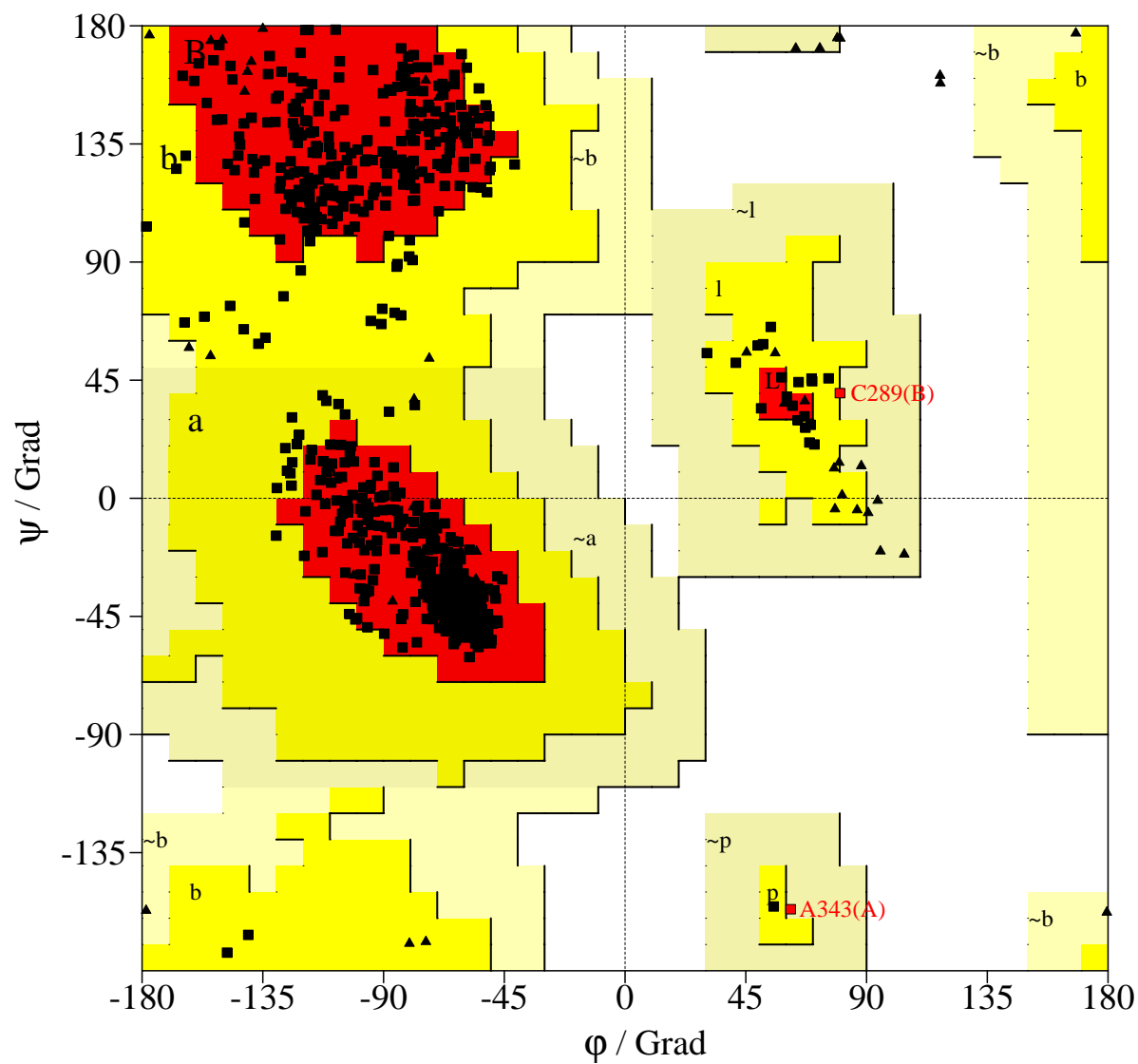


Abb. IV. 7: Ramachandran-Plot der endverfeinerten *T. cruzi*-TAT-Struktur. Glycine sind als Dreiecke dargestellt. Die dunkel unterlegten Bereiche entsprechen den günstigsten ϕ/ψ -Kombinationen. Nur die beiden markierten Aminosäuren fallen leicht aus diesen Zonen heraus.

IV.2 Struktureller Teil

In diesem Abschnitt wird die Struktur der *T. cruzi*-TAT in verschiedenen Aspekten beschrieben. Besonderes Augenmerk wird auf den Vergleich mit anderen Aminotransferasen gelegt, wobei der Unterschied zu der für den Molekularen Ersatz verwendeten Struktur von *E. coli* Aspartat-Aminotransferase (PDB-Code 1ars bzw 1art; Okamoto *et al.*, 1994) und zur kürzlich in der Literatur erschienen Aromaten-Aminotransferase aus *Paracoccus denitrificans* (PDB-Code 1ay4, 1ay5 bzw. 1ay8; Okamoto *et al.*, 1998) im Mittelpunkt steht.

Aufgrund der großen Anzahl von Insertionen und Deletionen ist es notwendig, für *T. cruzi*-TAT eine eigene Sequenznummerierung zu verwenden. Äquivalente Positionen in den hier verglichenen Strukturen besitzen daher verschiedene Nummern.

IV.2.a Die Struktur von *T. cruzi*-TAT

IV.2.a.1 Das vollständige Molekül

Das *T. cruzi*-TAT-Homodimer besitzt eine S-förmige Gestalt mit den maximalen Abmessungen 100.1, 66.7 und 57.3 Å (Abb. IV.8). Die in der endverfeinerten Struktur enthaltenen 825 der nach der Sequenz vorhergesagten 832 Aminosäuren umfassen ein Gesamtvolumen von 118047 Å³, wobei die Oberfläche des Moleküls 24690 Å² einnimmt. Durch den Kontakt zwischen beiden Untereinheiten wird die Oberfläche um ca. 5620 Å² entsprechend 18.5 % des Monomers reduziert (Berechnungen mit GRASP; Nichols *et al.*, 1991).

Die Faltungstopologie der Einzelkette weist das Protein als Mitglied der Klasse-I-Aminotransferasen-Familie aus. Bei diesen Strukturen besteht das Monomer aus zwei Domänen, denen im Enzym unterschiedliche Funktionen zukommen: Während der zentrale Sequenzbereich für die Bindung des Kofaktors PLP verantwortlich ist, fällt der kleineren, aus Aminosäuren des N- und C-Terminus zusammengesetzten Domäne die Aufgabe der Substratbindung zu. Die bisher bekannten Strukturen aus dieser Enzymklasse zeichnen sich dadurch aus, daß die kleine Domäne bei Bindung eines Substratmoleküls eine Bewegung in Richtung der großen Domäne des zweiten Monomers vollführt, wodurch ein Austritt des gebundenen Moleküls aus dem aktiven Zentrum verhindert wird.

Durch Übereinanderlegen von offener und geschlossener Konformation lassen sich die beiden Faltungsdomänen sequentiell voneinander abgrenzen. Im Falle der hier vorgestellten *T. cruzi*-TAT-Struktur ist diese Methode aufgrund des Fehlens experimenteller Daten über die Substratbindung jedoch nicht anwendbar. Die Domänengrenzen wurden daher mit anderen

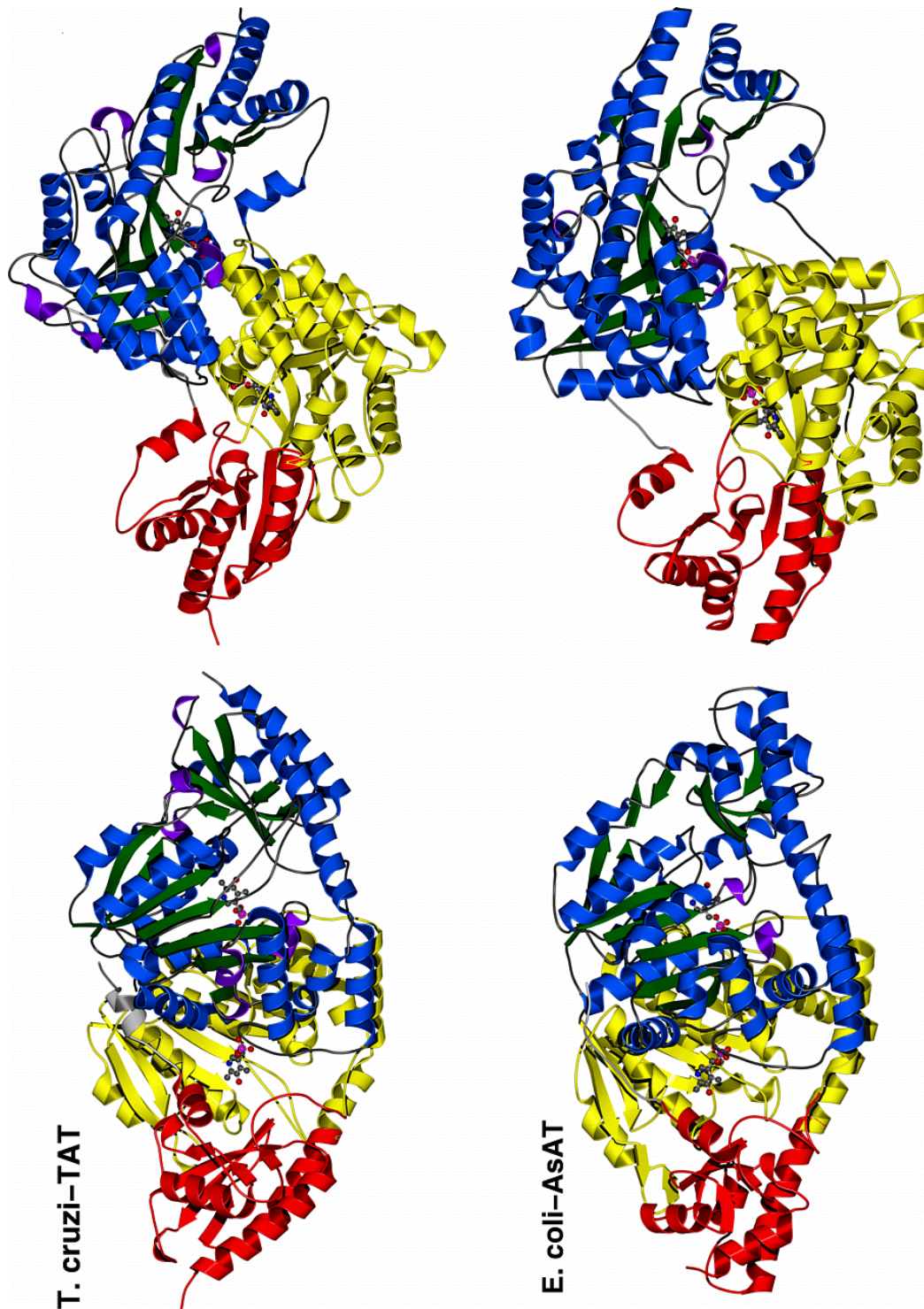


Abb. IV.8: Ribbons-Darstellung von *T. cruzi*-TAT und *E. coli*-AsAT (Iars; Okamoto *et al.*, 1994) in zwei Orientierungen. Eines der Monomere ist nach Domänen (rot: substratbindende, gelb: kofaktorbindende Domäne), das andere nach Sekundärstruktur (blau: α -Helix, grün: Faltblatt, lila: 3_{10} -Helix) eingefärbt.

Mitteln bestimmt. Das N-terminale Ende der substratbindenden Domäne (Leu 49) ermittelte das Programm DETECTIVE (Swindells, 1995), das Faltungseinheiten anhand unabhängiger hydrophober Kerne identifiziert. Ihr C-Terminus (Ala 316) wurde nach Literaturangaben für *E. coli*-AsAT (Okamoto *et al.*, 1994) durch Überlagerung beider Strukturen in BRAGI

(Schomburg & Reichelt, 1988) abgeleitet. Die dadurch in zwei Abschnitte unterteilte Helix $\alpha 13$ besitzt bei *T. cruzi*-TAT an dieser Grenze einen deutlichen Knick. Insgesamt besteht die substratbindende Domäne demnach aus den Abschnitten Asn 17 bis Asn 48 und Lys 317 bis Ala 416. Der nicht in eine der beiden Domänen aufgenommene N-Terminus liegt mit ausgestreckter Konformation auf der Substratbindungseinheit des benachbarten Monomers. Bei *T. cruzi*-TAT findet sich hier eine Helix, die in der Struktur von *E. coli* AsAT nicht beobachtet wird.

IV.2.a.2 Die kofaktorbindende Domäne

Nach der CATH-Einteilung (CATH = **C**lass **A**rchitecture **T**opology **H**omologous Superfamily; Orengo *et al.*, 1997) gehören beide Domänen zur α/β -Klasse.

Die substratbindende Einheit wird von einem mehr oder weniger flachen Faltblatt, das auf beiden Seiten von Helices flankiert ist, beherrscht und besitzt somit eine $\alpha/\beta/\alpha$ -Sandwich-Architektur.

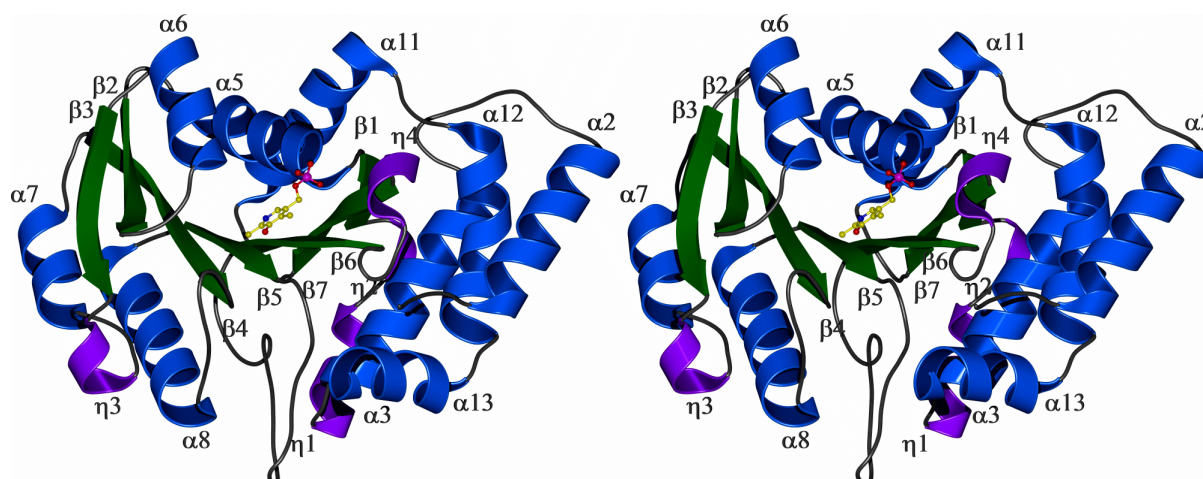


Abb. IV.9 Stereobild der kofaktorbindenden Domäne. Pyridoxalphosphat ist als Kugel- und Stabmodell gezeigt, Sekundärstrukturelemente sind konsequent nummeriert.

Ihre Faltung wird als Aspartat-Aminotransferase-Domäne 2 bezeichnet (CATH-Nr. 3.40.640). Sie wurde bisher nur in PLP-bindenden Enzymen vom Faltungstyp I (Kap. I.3) wie der tetrameren Tyrosin-Phenol-Lyase aus *Citrobacter intermedius* (PDB 1tpl, EC 4.1.99.2; Antson *et al.*, 1993), 2,2-Dialkylglycin-Decarboxylase aus *Pseudomonas cepacia* (tetramer, PDB 2dkb, EC 4.1.1.64; Toney *et al.*, 1993), Ornithin-Decarboxylase aus *Lactobacillus 30 A* (biologisch aktiv als Dodekamer, PDB 1ord, EC 4.1.1.17; Momany *et al.*, 1995) oder Glutamat-Semialdehyd-Aminotransferase (dimer, PDB 2gsa, EC 5.4.3.8; Hennig *et al.*, 1997), einem Enzym aus der Chlorophyllsynthese im Cyanobakterium *Synechococcus PCC6301*, gefunden.

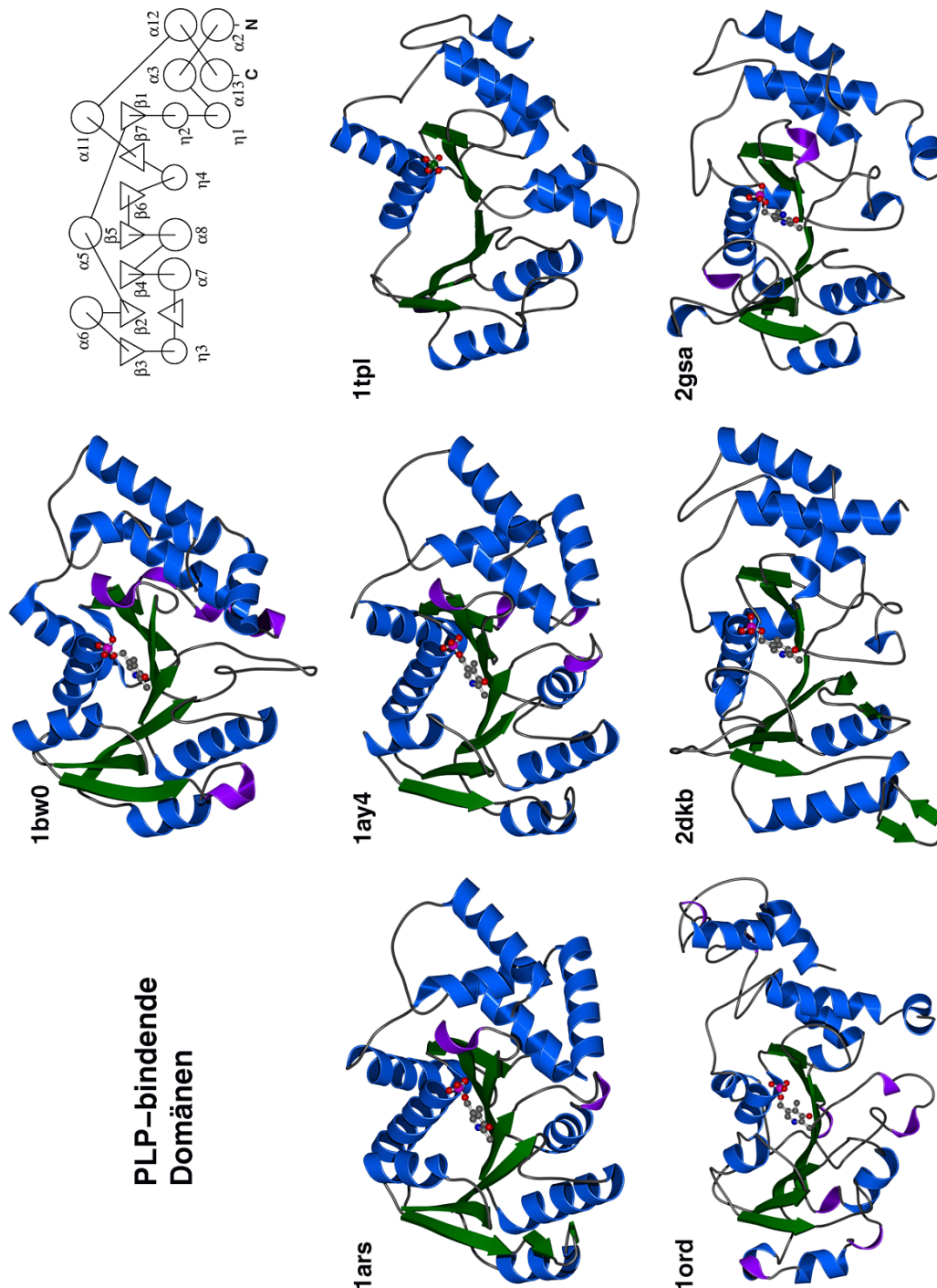


Abb. IV.10: Kofaktorbindende Domänen aus verschiedenen PLP-abhängigen Enzymen und schematische Darstellung der Faltungstopologie in *T. cruzi*-TAT (PDB-code: 1bw0)

Diese Proteine bilden aufgrund ihrer gemeinsamen Abstammung eine Homologe Superfamilie (CATH-Nr. 3.40.640.10), die sich nach den oben angegebenen repräsentativen Strukturen derzeit in vier Sequenzgruppen aufspaltet (2gsa und 1ay4 Frühjahr 1999 noch nicht in CATH klassifiziert).

Im Vergleich mit *E. coli*-AsAT ist das siebensträngige gemischte Faltblatt der Reihenfolge

3245671 (Strang $\beta 7$ ist antiparallel zum Rest) konserviert. Für die Sequenzbereiche Val 93 bis Asn 106 und Phe 224 bis Arg 245 ergeben sich jedoch starke Abweichungen. In der ersten Region ist *T. cruzi*-TAT nicht α -helikal, sondern besitzt zwei 3_{10} -Helices ($\eta 1$ und $\eta 2$). Die zweite Zone enthält bei *E. coli*-AsAT eine geknickte lange α -Helix ($\alpha 9$ und $\alpha 10$), wohingegen *T. cruzi*-TAT an dieser Stelle eine stark aus der Oberfläche herausragende Schleife bildet, die zum Strang $\beta 6$ zurückläuft. Beide Abschnitte liegen räumlich benachbart, so daß sich die strukturellen Abweichungen gegenseitig zu stabilisieren scheinen. Des weiteren bestehen in einigen Loop-Regionen größere Unterschiede, die jedoch nicht zu einer wesentlichen Änderung der Topologie führen. So besitzt die Tyrosin-Aminotransferase z.B. im Bereich Pro 159 bis Asn 161 eine kurze 3_{10} -Helix ($\eta 3$) mit einem anschließenden β -Abschnitt aus zwei Aminosäuren, der antiparallel zu $\beta 3$ läuft, während *E. coli*-AsAT die Oberflächenschleife mit Hilfe zweier kurzer, vom zentralen Faltblatt abgetrennter β -Stränge stabilisiert.

IV.2.a.3 Die substratbindende Domäne

Die substratbindende Domäne besteht aus einer von zwei Faltblättern gebildeten Schicht, die auf einer Seite von Helices gesäumt ist. Sie ist damit als α/β -Sandwich einzuordnen.

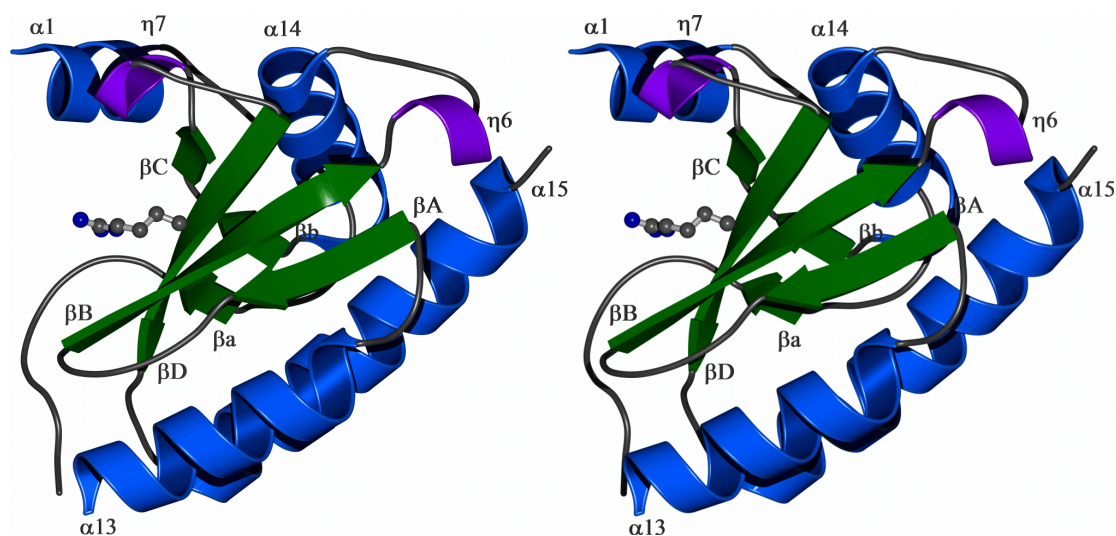


Abb. IV.11: Stereobild der substratbindenden Domäne in *T. cruzi*-TAT. Das α -carboxylatbindende Arg 389 ist als Ball- und Stabmodell gezeigt.

Ihre Faltungstopologie wird als α/β -Zopf (engl. α/β -plait) bezeichnet. Aufgrund der geringen Anzahl von Sekundärstrukturelementen in dieser Domäne bestehen Ähnlichkeiten mit vielen anderen Proteinfamilien, so daß nur ein Vergleich auf der H-Ebene von CATH (CATH-Nr. 3.30.70.160) vorgenommen wird. Auch hier finden sich wieder eindeutige Verwandtschafts-

beziehungen zu den für die große Domäne gegebenen repräsentativen Enzymen. Die bakterielle Ornithindecaboxylase 1ord bildet dabei eine Ausnahme, denn dieses Protein besitzt N- und C-terminal noch jeweils eine weitere Faltungseinheit, so daß die kleine substratbindende Domäne hier aus einem konsekutiven Sequenzabschnitt zusammengesetzt ist, während sie bei allen anderen Beispielen aus Aminosäuren von N- und C-Terminus besteht.

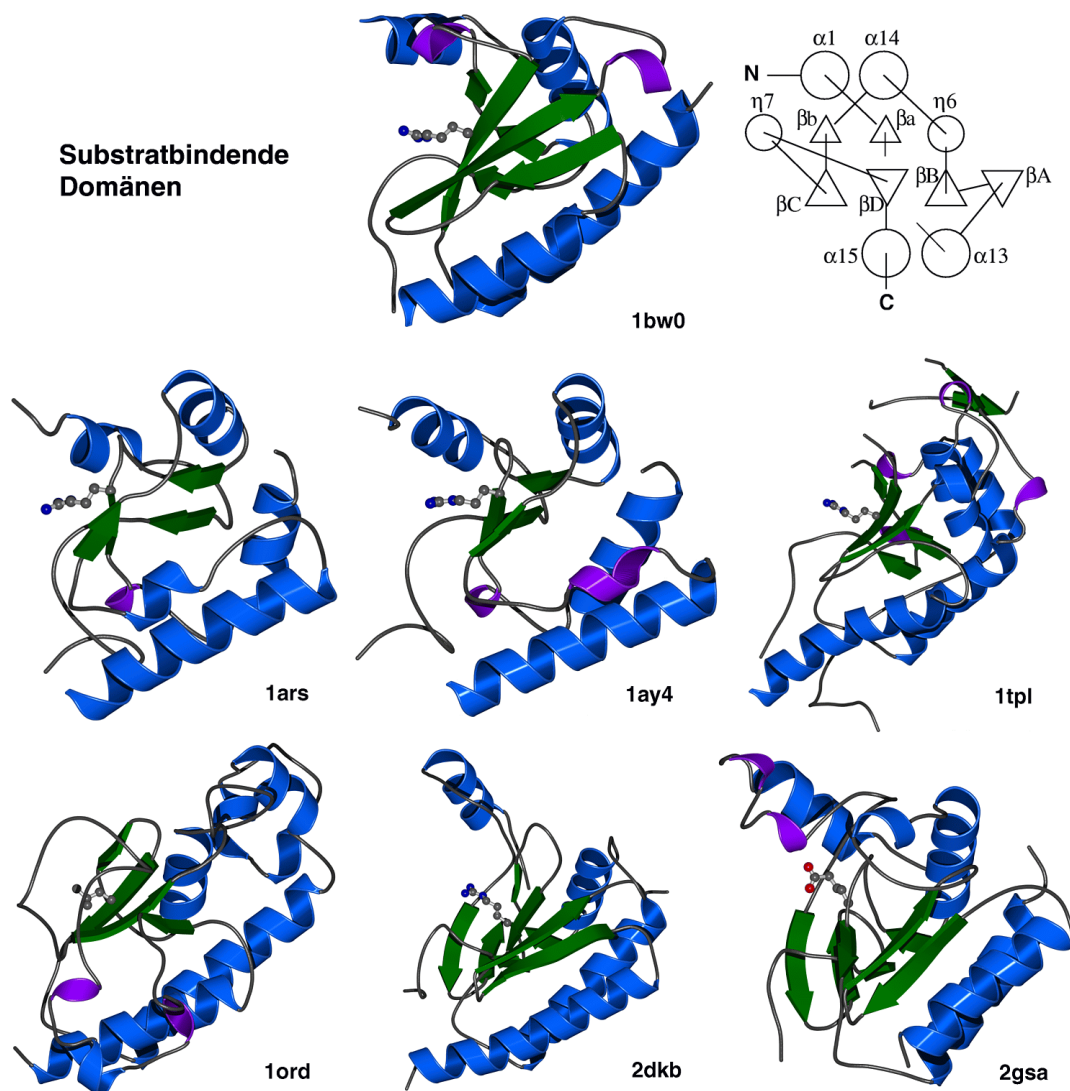


Abb. IV.12: Substratbindende Domänen aus verschiedenen PLP-abhängigen Enzymen und schematische Darstellung der Faltungstopologie in *T. cruzi*-TAT. Die zum substratbindenden Arg 389 äquivalente Position ist angezeigt.

In *T. cruzi*-TAT wird die kleine Domäne aus 131 Aminosäuren gebildet, während sie in *E. coli*-AsAT nur 117 Reste umfaßt. Dies führt dazu, daß das antiparallele Faltblatt in *T. cruzi*-TAT

stärker ausgeprägt ist und vier Stränge besitzt, während beim Suchmodell und bei *P. denitrificans*-ArAT nur die beiden zentralen Stränge vom Sekundärstrukturerkennungsprogramm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) gefunden werden. Die Unterschiede zu *E. coli*-AsAT finden sich in einer deutlichen Verkürzung von Helix $\alpha 13$ und in zwei großen Insertionen vor Helix $\alpha 14$ und Faltblattstrang βD wieder. Der erste dieser Sequenzeinschübe führt außerdem dazu, daß der C-Terminus von *T. cruzi*-TAT nicht wie bei der bakteriellen Aspartat-Aminotransferase frei ist, sondern eine faltblattartige Wechselwirkung zwischen den Bereichen Lys 354 bis Arg 356 und His 413 bis Ala 415 besteht (nicht gezeigt).

IV.2.a.4 Kontakte zwischen kofaktor- und substratbindender Domäne

Der Kontakt zwischen kofaktor- und substratbindender Domäne reduziert die Oberfläche der freien Domänen um ca. 2200 Å². Auf Seiten der kofaktorbindenden Untereinheit durchzieht ein Graben die Berührungsfläche, durch den der Abschnitt Arg 341 bis Met 344 aus der substratbindenden Einheit läuft. Mehrere Wasserstoffbrücken, die in *E. coli*-AsAT und *P. denitrificans*-ArAT nicht beobachtet werden, verzahnen die Domänen hier in einer an ein β -Faltblatt erinnernden Gruppierung ineinander (Abb. IV.13).

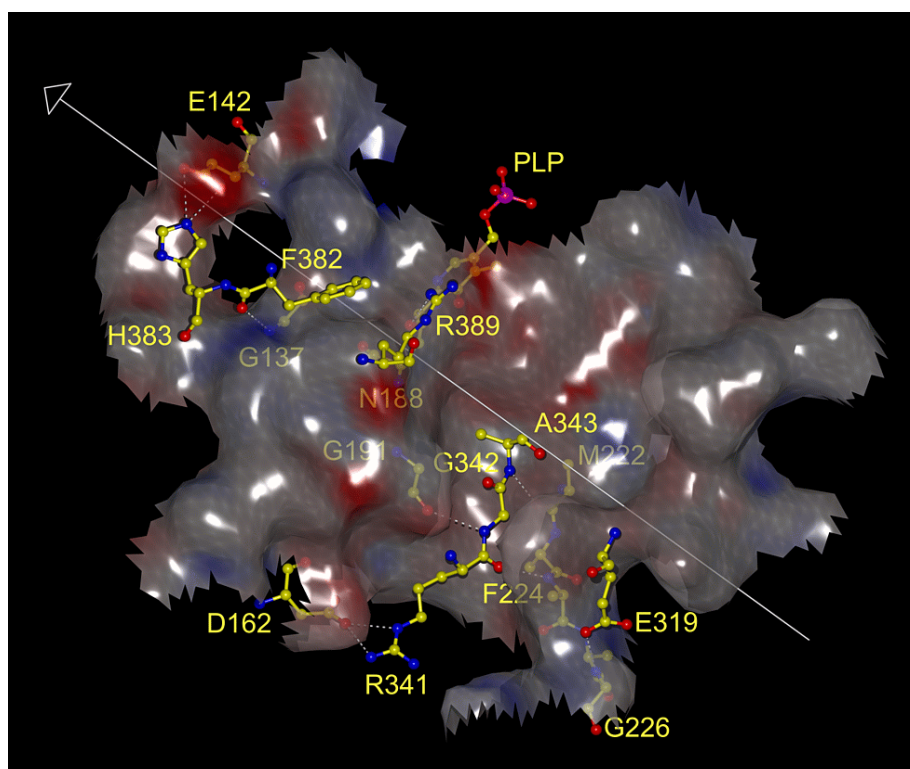


Abb. IV.13: Kontakte zwischen den Domänen. Die Oberfläche (PLP-bindende Domäne) ist nach Potential eingefärbt. Der Graben verläuft senkrecht zur angezeigten Drehachse (berechnet m. HINGEFIND; Wriggers & Schulten, 1997)

Eine Übersicht über polare Wechselwirkungen zwischen den Domänen verschafft Tab. IV.5.

Rest, große Domäne	Atom	Rest, kleine Domäne	Atom	Abstand	Art
G137	N	F382	O	3.3	H
E142	Oε1	H383	Nε2	2.9	S
E142	Oε2	H383	Nε2	3.3	S
D162	Oδ2	R341	Nε	3.0	S
D162	Oδ2	R341	Nζ2	3.1	S
N188	Oδ1	R389	Nζ1	3.2	H
G191	O	G342	N	3.3	H
G191	O	R341	Nζ1	2.8	H
M222	O	A343	N	3.0	H
F224	N	R341	O	2.8	H
G226	N	E319	Oε2	2.9	H

Tab. IV.5: Polare Wechselwirkungen ($2.5 \text{ \AA} \leq d \leq 3.3 \text{ \AA}$) zwischen kofaktor- und substratbindender Domäne (Monomer A), berechnet mit ACT aus CCP4. H: Wasserstoffbrücke, S: Salzbrücke

Im Vergleich zu *E. coli*-AsAT fällt der Kontakt zwischen den Domänen in *T. cruzi*-TAT wesentlich intensiver aus: Zum einen ist die Berührungsfläche im bakteriellen Enzym um etwa 35 % verringert, zum anderen existieren dort nur fünf (gegenüber elf) polare Wechselwirkungen zwischen den Domänen, und der in *T. cruzi*-TAT gefundene Graben wird dort ebenfalls nicht beobachtet. Möglicherweise ist daher die bei der Substratbindung zu erwartende Schließungsbewegung von *T. cruzi*-TAT erschwert.

Nicht bei allen Aminotransferasen geht die Substratbindung mit einer Konformationsänderung einher. So schließt sich z.B. die zur Klasse II gehörende humane Ornithin-Aminotransferase bei Inhibierung durch (2S, 5S)-5-Fluoromethylornithine (PDB-Code 2oat; Storici *et al.*, 1999) nicht. In der hier vorgestellten *T. cruzi*-TAT-Stuktur läßt sich jedoch bereits eine Tendenz zur Konformationsänderung nachweisen: werden die kofaktorbindenden Domänen der beiden in der asymmetrischen Einheit des Kristalls enthaltenen Monomere übereinandergelegt, so kommen die substratbindenden Domänen nicht zur Deckung. Es zeigt sich, daß das aktive Zentrum von

Monomer A etwas stärker geschlossen ist. Dieser Effekt ist offenbar durch Kristallpackungskontakte verursacht und daher weniger stark ausgeprägt als bei der durch den Inhibitor α -Methylaspartat geschlossenen Struktur von *E. coli*-AsAT 1art. Die am weitesten von der Domänengrenze entfernte Aminosäure Lys 33 bewegt sich in *T. cruzi*-TAT um 1.2 Å entsprechend einer Rotation von 1.5° um die in Abb. IV.13 angedeutete Achse, während bei *E. coli*-AsAT eine Positionsverschiebung bis zu 3.8 Å beobachtet wird (6.7°-Rotation um eine Achse mit ähnlicher Lage).

IV.2.a.5 Kontakte zwischen den Monomeren

Zwischen Monomer A und B besteht eine Vielzahl hydrophober und polarer Kontakte. Wechselwirkungen zwischen Hauptkettenatomen aus beiden Ketten sind gemäß der wahrscheinlichen Unabhängigkeit des Monomerfaltungsvorgangs selten und treten niemals an aufeinanderfolgenden Aminosäuren auf. Wie aus Tabelle IV.6 ersichtlich wird, häufen sich die polaren Kontakte in fünf Zonen des Proteins (N-Terminus, Reste 60-71, 122-126, 259-260 und 283-293).

Rest, Monomer A	Atom	Rest, Monomer B	Atom	Abstand	Art
V6	O	S276	O γ	3.1	H
S9	N	A123	O	2.9	H
S9	O γ	T122	O	2.7	H
N10	N	D126	O δ 1	3.2	H
N10	N	D126	O δ 2	2.6	H
H11	N	D126	O δ 1	3.3	S
G13	O	R283	N ζ 1	3.1	H
V15	O	R283	N ζ 1	3.3	H
D42	O δ 2	Y71	N	3.1	H
K60	N ϵ	D64	O δ 2	3.2	S
K60	N ϵ	D64	O δ 1	3.0	S
D64	O δ 2	K60	N ϵ	2.7	S
D64	O δ 1	K60	N ϵ	2.7	S
E67	O δ 2	K47	N ϵ	3.0	S
N69	O	G259	N	2.8	H

N69	O δ 1	W260	N ϵ 1	2.6	H
Y71	N	D42	O δ 2	3.2	H
Y71	O η	Plp 253	OP3	2.7	H
A123	O	S9	O γ	3.3	H
A123	O	S9	N	2.8	H
D126	O δ 1	N10	N	2.8	H
D126	O δ 2	N10	N	2.9	H
H140	N ϵ 2	L287	O	3.1	H
G259	N	N69	O	2.9	H
G259	O	T293	N	2.8	H
G259	O	T293	O γ 1	3.2	H
W260	N ϵ 1	N69	O δ 1	2.9	H
L287	O	H140	N ϵ 2	3.1	H
T293	N	G259	O	2.8	H
T293	O γ 1	G259	O	3.1	H
Plp 253	OP3	Y71	O η	2.8	H

Tab. IV.6: Polare Wechselwirkungen ($2.5 \text{ \AA} \leq d \leq 3.3 \text{ \AA}$) zwischen Monomer A und B, berechnet mit ACT aus CCP4. H: Wasserstoffbrücke, S: Salzbrücke

Der kurze N-terminale Abschnitt besitzt aufgrund seiner ausgestreckten Konformation eine überdurchschnittliche Anzahl von Kontakten mit der Nachbarkette und leistet so einen großen Beitrag zur Stabilität des Dimers (Abb. IV.14). Ein derartiger “Armaustausch” wird häufig bei oligomeren Proteinstrukturen beobachtet. Am Ende des Arms findet sich oft ein Prolin, das der Struktur eine größere Rigidität verleiht (Bergdoll *et al.*, 1997). Im Falle der Klasse-I-Aminotransferasen weist die hohe Konservierung von Pro 18 (*T. cruzi*-TAT) in den ansonsten sehr stark divergierenden Sequenzen auf die Bedeutung dieser Versteifung hin.

Die Dipolcharakteristik der Helix $\alpha 0$ wird durch Wechselwirkung mit Asp 126* am N- und mit Arg 283* am C-Terminus zur Fixierung des Armes ausgenutzt. Die Seitenkette von Trp 4 steckt in einer hydrophoben Tasche, die aus den Aminosäuren 210* bis 212* und 242* bis 244* des zweiten Monomers gebildet wird. Durch diese Befestigung ist Trp 4 die erste Aminosäure, die in der Elektronendichte sichtbar ist.

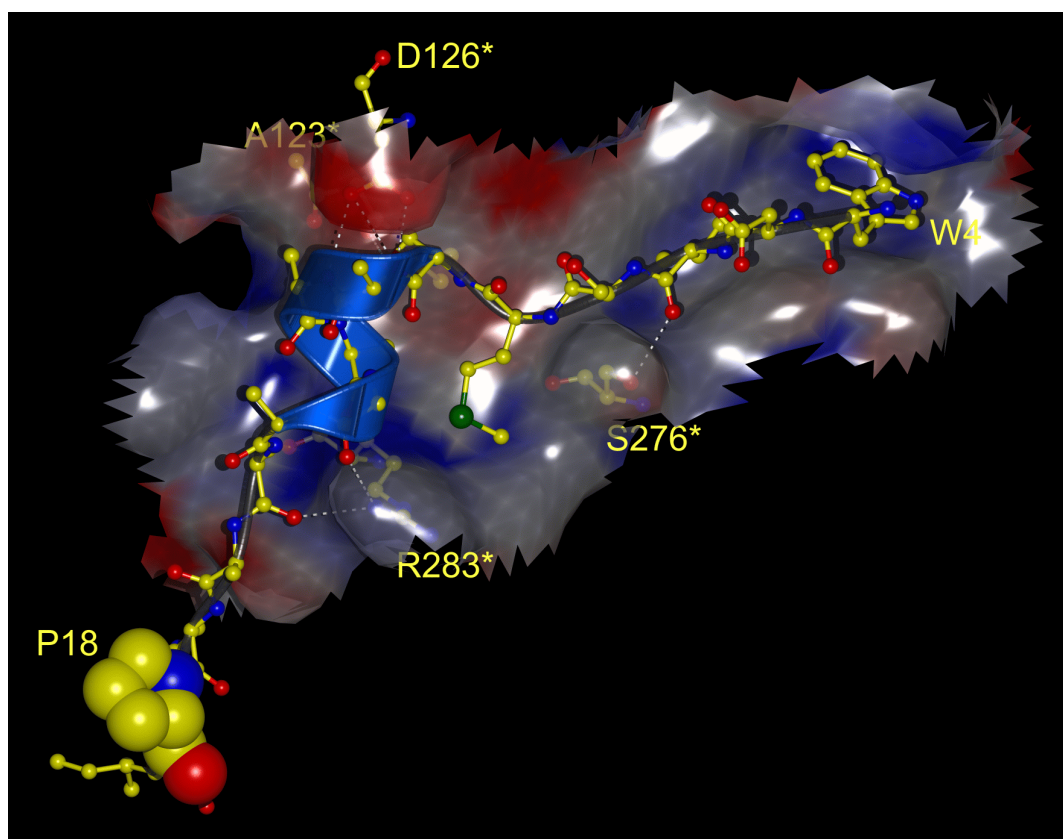


Abb. IV.14: Kontakte zwischen N-Terminus und benachbartem Monomer. Pro 18 ist vergrößert dargestellt. Die Helix α_0 ist als Band angedeutet.

Ein intensives Geflecht von Wasserstoffbrücken entsteht durch den Kontakt der Aminosäuren 259-260 (Monomer 1) mit Asn 69* und Thr 293* (jeweils Monomer 2). In unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen Bereichen liegt Arg 261 (Monomer 1), das einen Teil der negativen Ladung der PLP-Phosphatgruppe kompensiert, und Tyr 71* (Monomer 2), die einzige Aminosäure, die unmittelbar an der Bindung der Kofaktors im aktiven Zentrums der Nachbarkette beteiligt ist (Abb. IV.15)

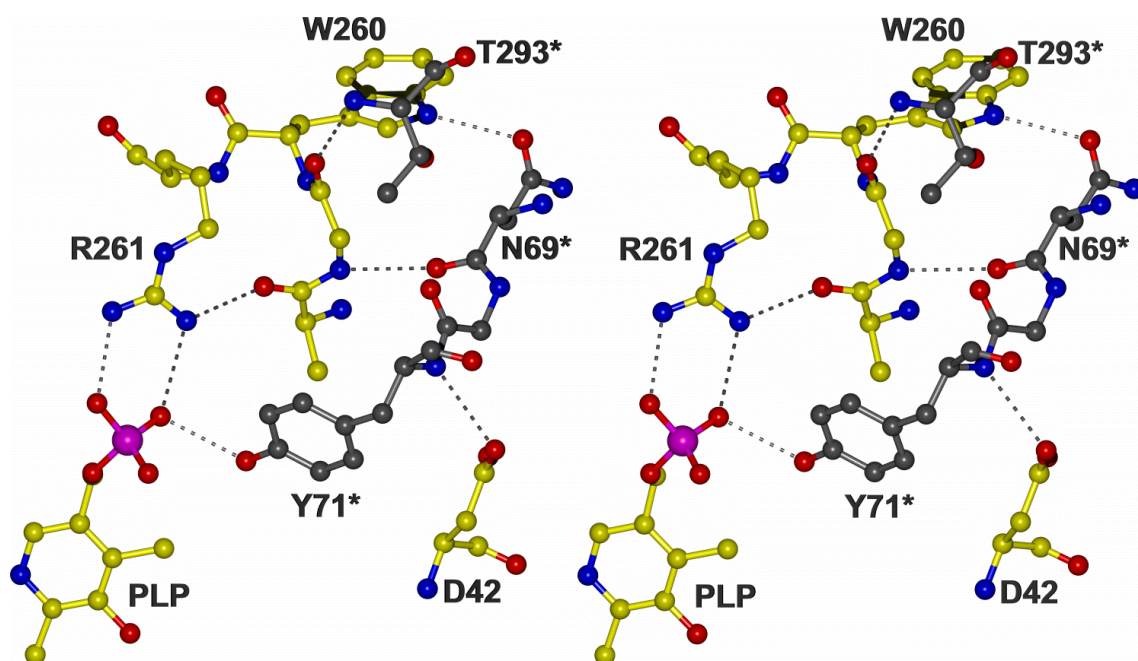


Abb. IV.15: Stereodarstellung des Wasserstoffbrückengeflechts zwischen Monomer 1 und 2 in Nähe des aktiven Zentrums

Direkt an der zweizähligen Achse, die Monomer A auf Monomer B abbildet, findet sich in den Aminosäuren 288 bis 292 das Sequenzmotiv VCGPC (Abb. IV.16), welches an das aktive Zentrum von Thioredoxinen mit der Sequenz WCGPC erinnert. Eine Thioredoxinaktivität läßt sich jedoch experimentell nicht nachweisen (Kalisz, 1997). Diese Beobachtung läßt sich aus der Struktur erklären: während der Sequenzabschnitt in *T. cruzi*-TAT eine ausgestreckte Konformation annimmt und sich die beiden Cysteine nicht nahekommen, wird in Thioredoxin eine helixartige Struktur gefunden, die zur Annäherung der beiden Aminosäuren führt (z.B. reduziertes humanes Thioredoxin, PDB 1ert; Weichsel *et al.*, 1996). Das Val 288 der Tyrosin-Aminotransferase kann außerdem nicht wie Tryptophan in Thioredoxinen eines der Cysteine aktivieren. Die ungewöhnlichen Hauptkettentorsionswinkel von *T. cruzi*-TAT in diesem Bereich werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zu fixierten Lösungsmittelmolekülen stabilisiert.

Interessanterweise kommen sich die Cysteine 292 beider Ketten sehr nahe und könnten durch Auswahl eines anderen Standardrotameres leicht in perfekte Disulfidbrückendistanz gebracht werden (Abb. IV.16). Es ergeben sich jedoch weder aus der Elektronendichte, die an dieser Stelle besonders klar ist, noch aus unter nichtreduzierenden Bedingungen durchgeführter SDS-Gelelektrophorese Hinweise auf eine kovalente Verbrückung der beiden Ketten im *T. cruzi*-TAT-

Dimer. Wahrscheinlich ist diese Position in der Kontaktfläche so stark abgeschirmt, daß oxidierende Reagenzien die Cysteine nicht erreichen können und es daher nicht zu einer Verbrückung kommt. Cys 292 findet sich auch in den Tyrosinamintransferasen von Mensch und Ratte, allerdings ist über die Disulfidkonfiguration dieser beiden Enzyme wenig bekannt (Dietrich *et al.*, 1991).

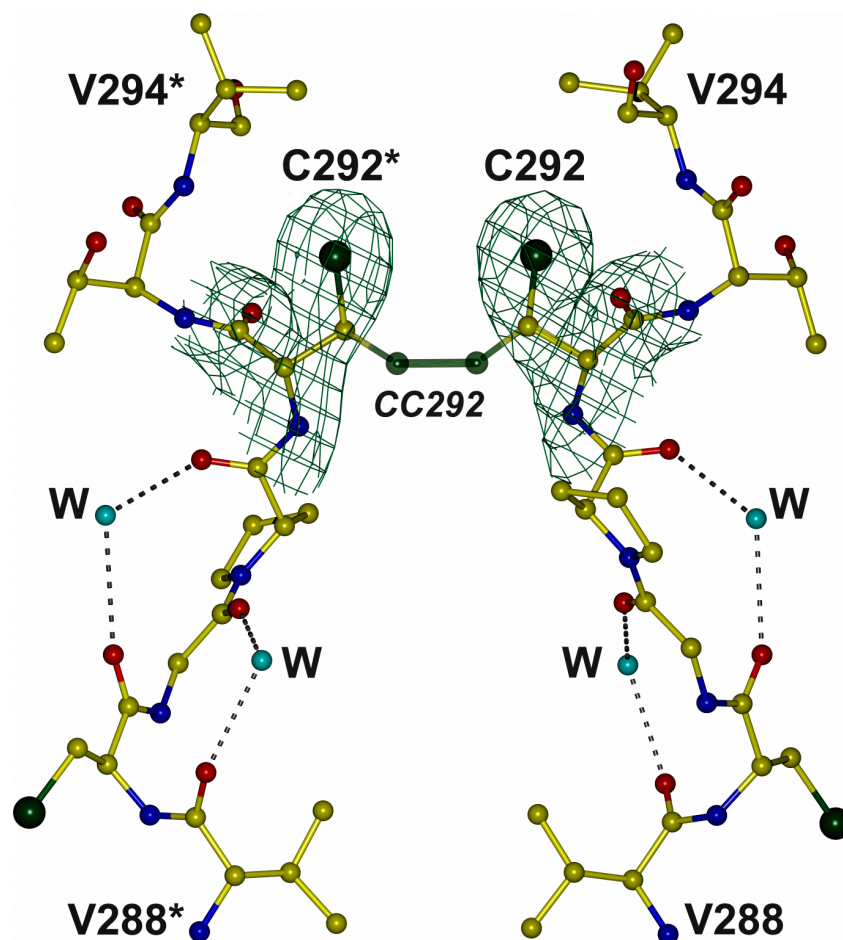


Abb. IV.16: Kontakte in Nähe der Dimerenachse. Die Elektrodichten an Cys 292 liefert keinen Hinweis auf eine Disulfidbrücke (hypothetisch: CC292).

IV.2.a.6 Strukturbasiertes Sequenzalignment von *T. cruzi*-TAT und *E. coli*-AsAT

Mit der Kenntnis von Strukturen kann durch Übereinanderlagerung ein objektiveres Sequenzalignment hergestellt werden. Dieses kann als Ausgangspunkt für den Vergleich mit weiteren Proteinen, die sich mit Alignmentprogrammen ohne Schwierigkeiten auf eine der überlagerten Strukturen beziehen lassen, dienen.

Das strukturbasierte Sequenzalignment zwischen *T. cruzi*-TAT und *E. coli*-AsAT (Abb. IV.17) zeigt deutlich, daß eine große Ähnlichkeit zwischen *E. coli*-AsAT und *P. denitrificans*-ArAT auf der einen und humaner, Ratten und *T. cruzi*-TAT auf der anderen Seite besteht. Hieraus läßt sich schließen, daß sich die Eigenschaften von *T. cruzi*-TAT nicht aus der Struktur der *P. denitrificans*-ArAT erklären lassen. In der Tat sind die beiden Proteine so unterschiedlich, daß sich die Strukturen 1ay4, 1ay5 bzw. 1ay8 (*P. denitrificans*-ArAT) nicht als Modelle für den Molekularen Ersatz der *T. cruzi*-TAT-Datensätze eignen.

Nach dem Alignment in Abb. IV.17 beträgt die Sequenzidentität zwischen Suchmodell 1art und endverfeinerter Struktur bzgl. *T. cruzi*-TAT 13.0 und bzgl. *E. coli*-AsAT 13.6 %.

Die geschlossene Konformation von *E. coli*-AsAT (1art) besitzt mit 384 innerhalb von 1.8 Å übereinanderlegbaren C α (von insgesamt 825) gegenüber 340 bei 1ars bessere Übereinstimmungen zu der hier ermittelten Struktur von Tyrosin-Aminotransferase aus *T. cruzi*, obwohl davon ausgegangen werden kann, daß es sich bei dieser aufgrund des Fehlens von Inhibitoren bzw. Substraten ebenfalls um eine offene Konformation handelt. Diese Beobachtung erklärt, warum der Molekulare Ersatz mit der offenen Struktur von *E. coli*-AsAT nicht erfolgreich war.

Die Superposition der verschiedenen Strukturen von *P. denitrificans*-ArAT mit *T. cruzi*-TAT führt nicht zu einem besseren Ergebnis als 1art (1ay4: 309, 1ay5: 355 und 1ay8: 333 vergleichbare C α -Positionen). Allerdings läßt sich auch hier wieder feststellen, daß die geschlosseneren Konformationen zu einer besseren Übereinstimmung führen. Offenbar entspricht die relative Anordnung der beiden Domänen in *T. cruzi*-TAT eher einer geschlossenen Struktur bei anderen Aminotransferasen aus Klasse I. Da beim Übergang von offen nach geschlossen der Zugang zum aktiven Zentrum erschwert wird, muß der Eintrittskanal bei *T. cruzi*-TAT, die noch zudem größere Substrate als Aspartat-Aminotransferase umsetzt, anders gestaltet sein. In der Tat wird in *T. cruzi*-TAT durch eine stärkere Ausschwenkung der Helix α 1 ein vergrößerter Eintrittskanal erzeugt (Abb. IV.18).

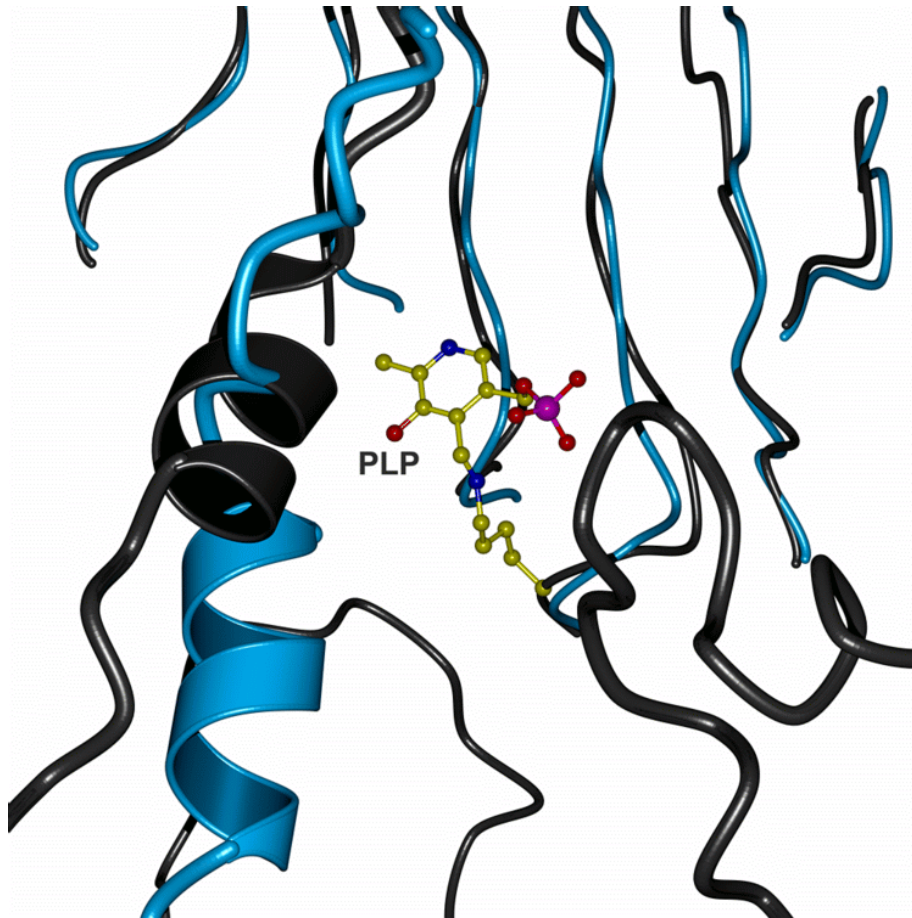


Abb. IV.18: Superposition von *T. cruzi*-TAT (grau) und *E. coli*-AsAT (blau) im Bereich des Substrateintrittskanals. Während die Faltblätter beider Proteine sehr ähnliche Positionen besitzen (Hintergrund) ist die N-terminale Helix $\alpha 1$ in *T. cruzi*-TAT weiter ausgeschwenkt.

Bei *P. denitrificans*-ArAT ist ebenfalls eine derartige Vergrößerung zu beobachten, allerdings ist sie hier weniger stark ausgeprägt als bei *T. cruzi*-TAT. Zusätzlich ist bei dem unkomplexierten bakteriellen Enzym die kleine Domäne noch etwas weiter aufgeschwenkt als bei der offenen Konformation von Aspartat-Aminotransferase aus *E. coli* (nicht gezeigt).

IV.2.a Das aktive Zentrum

Aminotransferasen bilden eine Enzymfamilie, die sich anhand von Sequenz- und Funktionsverwandtschaften in verschiedene Klassen aufspalten läßt. Innerhalb dieser Klassen existieren jeweils nur wenige absolut konservierte Aminosäuren (Mehta *et al.*, 1993). Im Falle der Klasse-I-Aminotransferasen handelt es sich hierbei fast ausnahmslos um an der Bindung des Kofaktors beteiligte Positionen (Asn 188, Asp 216, Tyr 219, Lys 253, Arg 261 in *T. cruzi*-TAT). Für substratbindende Reste sind die Anforderungen bzgl. der Erhaltung aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität geringer. Nur das α -carboxylatbindende Arginin (Arg 389, s. Abb. IV.12) findet sich in fast allen Klasse-I-Aminotransferasen wieder. Ein weiteres Beispiel für hohe Konservierung sind die cis-Proline 136 und 189. Die zweite dieser Aminosäuren trägt durch ihre ungewöhnliche Hauptkettenkonformation zur Positionierung von Asn 188 bei, das eine wichtige Wasserstoffbrücke mit dem negativ geladen phenolischen Sauerstoffatom des Kofaktors bildet. Es besteht jedoch kein absoluter Zwang für die Besetzung dieser beiden Positionen mit Prolin. Mutationsstudien in *E. coli*-AsAT ergeben, daß beide Proline gegen Alanin ausgetauscht werden können, ohne daß das Enzym seine Aktivität verliert. Die Kristallstrukturen der Mutanten zeigen, daß an Aminosäure 189 die cis-Bindung erhalten bleibt, während Alanin an Stelle 136 eine trans-Konformation einnimmt. Weiterführende Untersuchungen belegen, daß die beiden Proline dem Wildtypenzym einen faltungskinetischen Vorteil verschaffen (Birolo *et al.*, 1999). Abb. IV.19 zeigt das Geflecht von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen PLP und dem Protein in *T. cruzi*-TAT und *E. coli*-AsAT. Die aufgeführten Aminosäuren können in eine mit der Phosphatgruppe und in eine weitere, mit dem aromatischen Ringsystem des Kofaktors assoziierte Gruppe aufgeteilt werden. Außerdem läßt sich zwischen einer ersten, direkt mit dem Pyridoxal-5'-Phosphat in Kontakt stehenden und einer zweiten, zur Fixierung der ersten führenden Koordinationssphäre unterscheiden.

Der Mechanismus der Aminotransferasereaktion ist zwingend von der Beteiligung des aromatischen PLP-Ringsystems abhängig. Demgegenüber kommt der Phosphatgruppe zunächst nur eine Ankerfunktion für den Kofaktor zu. Entsprechend dieser Aufgabenverteilung bestehen unterschiedliche Anforderungen bezüglich der Konservierung von Aminosäuren aus der mit dem Pyridiniumring bzw. der PO_4 -Gruppe zugeordneten Gruppe: während alle Positionen aus dem ersten Kreis durch alle Klasse-I-Aminotransferasen konserviert sind, findet sich von den phosphatbindenden Resten nur Arg 261 in allen diesen Enzymen wieder. Ein Arginin ist besonders gut für die Bindung polyedrischer Oxoanionen geeignet, weil es diese in einer chelatartigen Wechselwirkung fixieren und so Bewegungen des Anions verhindern bzw. mit der des Proteins koordinieren kann.

Neben dem Arginin ist als weiteres Motiv der Phosphatbindung nur die Positionierung von Helix $\alpha 5$ erhalten. Diese gleicht über ihren positiv polarisierten N-Terminus einen Teil der

anionischen Ladung aus (s. auch Abb. IV.9).

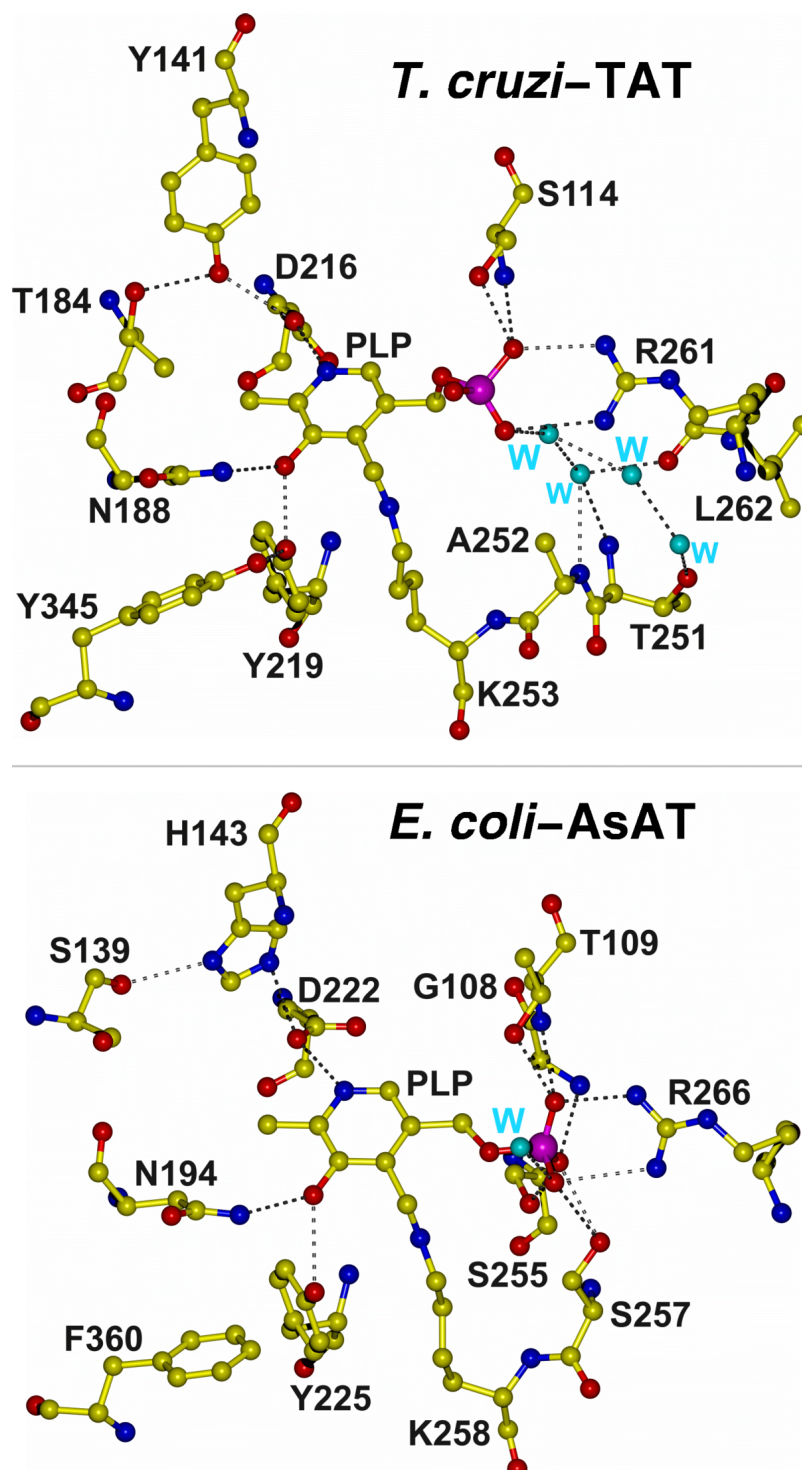


Abb. IV.19: Hydrophile Wechselwirkungen zwischen Kofaktor und Protein in *T. cruzi*-TAT und *E. coli*-AsAT (PDB: 1ars; Okamoto *et al.*, 1994)

Für die Aminosäuren der zweiten Koordinationssphäre ergeben sich größere Unterschiede zwischen *T. cruzi*-TAT und *E. coli*-AsAT. Hier sind nicht nur die Seitenketten verändert, sondern die beteiligten Reste stammen zum Teil auch aus unterschiedlichen Sequenzabschnitten des Proteins. In *T. cruzi*-TAT übernimmt Tyr 141 aus Helix $\alpha 6$ die Aufgabe von His 143, und Thr 184 aus Faltblattstrang $\beta 4$ tritt an die Stelle von Ser 139 aus $\beta 2$ in *E. coli*-AsAT. Es scheint, daß diese Dreiergruppen für das Protein nicht von essentieller Bedeutung sind: ein Austausch von His 143 zu Alanin in *E. coli*-AsAT führt lediglich zu einer Halbierung der Umsatzrate (Yano *et al.*, 1991).

Tyr 345 in *T. cruzi*-TAT erweitert das Wasserstoffbrückennetzwerk für das phenolische Sauerstoffatom des Kofaktors gegenüber dem der bakteriellen Aspartat-Aminotransferase, die an dieser Position ein Phenylalanin besitzt. Wie erste Ergebnisse aus Mutationsstudien zeigen, wird die Enzymaktivität durch den Austausch dieses Tyrosins gegen Phenylalanin allerdings nur geringfügig beeinflußt (Nowicki, 1999).

Der Bindungsmodus der Phosphatgruppe weicht in verschiedenen PLP-abhängigen Enzymen stark voneinander ab. Während die drei Sauerstoffatome in *E. coli*-AsAT acht direkt vom Protein stammende Wasserstoffatome binden und das verbleibende Elektronenpaar durch Fixierung eines Wassermoleküls abgesättigt wird (Tyr 70* in Abb. IV.19 nicht gezeigt), bietet die Proteinkette in *T. cruzi*-TAT nur fünf Wasserstoffatome zur Brückenbildung an (Tyr 71* nicht gezeigt). Zusätzlich verbindet ein Wassermolekül über das in Abb. IV.19 angedeutete Netzwerk eine weitere Valenz der Phosphatgruppe mit dem Proteingerüst. Weniger Protein-Wasserstoffdonoren (vier) wurden bisher nur in 2,2-Dialkylglycin-Decarboxylase aus *Pseudomonas cepacia* (PDB-Code 2dkb; Toney *et al.*, 1993) gefunden. Dieses Enzym zeigt zwar ebenfalls den Faltungstyp I, besitzt aber an der zu Position 261 äquivalenten Stelle kein Arginin. Die als Dimer von Dimeren zu bezeichnende Decarboxylase stabilisiert die PO_4 -Gruppe des Kofaktors stattdessen durch mehrere Wassermoleküle und durch Wechselwirkung mit den positiv polarisierten N-Termini von α -Helizes aus zwei benachbarten Proteinketten.

Im Vergleich zu *E. coli*-AsAT ist die Bindungsstelle für die Phosphatgruppe im Enzym aus *Trypanosoma cruzi* hydrophober. Dies liegt in der Substitution von Ser 257 aus dem *E. coli*-Enzym gegen Ala 252 in *T. cruzi*-TAT und in der Abwesenheit der Seitenkette des Ser 255 begründet, deren Raum das hydrophobere Ile 218 in *T. cruzi*-TAT einnimmt (Abb. IV.20). Das Isoleucin stützt anstelle von Ala 224 gleichzeitig den Pyridiniumring von der Unterseite. Auf der Oberseite resultiert der konservative Austausch von Trp 140 für Phe 138 in der Erhaltung der aromatischen Stapelwechselwirkung.

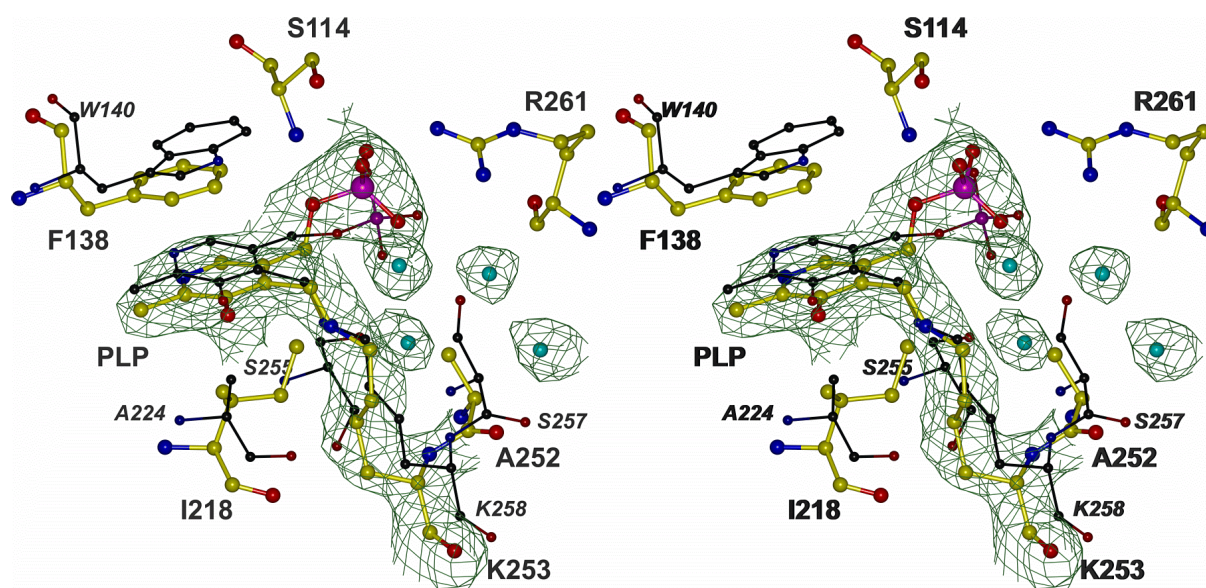
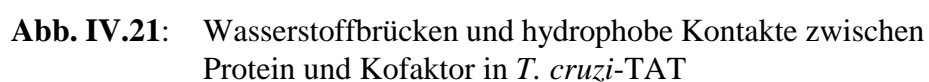


Abb. IV.20: Stereodarstellung von σ_A -gewichteter 2fofc-Elektronendichte (1.25σ) der Schiff'schen Base und wichtiger Wassermoleküle im aktiven Zentrum von *T. cruzi*-TAT. Korrespondierende Aminosäuren aus *E. coli*-AsAT sind mit dünner Strichstärke wiedergegeben.

Die veränderte Phosphatbindungsstelle führt dazu, daß das Pyridoxalphosphat in *T. cruzi*-TAT andere Torsionswinkel ($\phi = -87^\circ$ und $\psi = 147^\circ$; Definition s. Abb. IV.21) als in *E. coli*-AsAT ($\phi = -15^\circ$ und $\psi = -177^\circ$) aufweist und die PO_4 -Gruppe außerdem unterschiedlich um die verbrückende P-O-Bindung rotiert ist. Hierdurch besetzt das dritte Sauerstoffatom des Phosphats in *T. cruzi*-TAT in etwa die Position, an der in *E. coli*-AsAT das Wassermolekül gefunden wird, während bei dem bakteriellen Enzym das nicht mit Arg 266 assoziierte Sauerstoffatom die Stelle des verbrückenden Wassermoleküls aus *T. cruzi*-TAT besetzt. Insgesamt ist die PO_4 -Gruppe somit in Richtung der Substratbindungsstelle verschoben.

Durch die abweichende Positionierung der Phosphatgruppe in *T. cruzi*-TAT erhält das nicht mit Arg 261 in Kontakt stehende dritte Sauerstoffatom OP1 keinen Wasserstoffbrückenbindungspartner aus der Proteinkette. Im hier vorgestellten Strukturmodell von *T. cruzi*-TAT, das auf einem relativ unvollständigen Reflexdatensatz mit einer Auflösung von 2.5 \AA basiert, ist dieses Sauerstoffatom in beiden aktiven Zentren in überhaupt keiner Wasserstoffbrücke involviert, obwohl die verbleibende Differenzelektronendichte die Anwesenheit dreier sehr schwach gebundener Wassermoleküle in Wasserstoffbrückenbindungsabstand andeutet.

Abb. IV.21 liefert eine schematische Übersicht über die Kontakte des Kofaktors.



Ein weiterer Unterschied zwischen den aktiven Zentren von *T. cruzi*-TAT und *E. coli*-AsAT ergibt sich aus der Konformation der Lysinseitenkette in der Schiff'schen Base. Abb. IV.20 zeigt, daß die Elektronendichte mit einer gestaffelten Konformation, wie sie in der bakteriellen Aspartat-Aminotransferase beobachtet wird, nicht vereinbar ist. Stattdessen wird eine fast ekliptische Stellung (Mittelwert Monomer A/B: $\chi_4 = 37^\circ$; *E. coli*-AsAT: $\chi_4 = -158^\circ$) eingenom-

men. Durch diese energetisch ungünstigere Anordnung der Atome wird das interne Aldimin möglicherweise in Richtung einer Bindungsöffnung destabilisiert und somit für die Transaminierungsreaktion aktiviert. So ist die hier gefundene Konformation von Lys 253 in *T. cruzi*-TAT derjenigen der PMP-Form von *E. coli*-AsAT sehr ähnlich (Miyahara *et al.*, 1994). Eine vergleichbare Seitenkettenstellung wird auch in der PLP-Form von *E. coli* Phosphoserin-Aminotransferase beschrieben (Hester *et al.*, 1999). Der mögliche Einfluß auf das Säure/Base-Verhalten des internen Aldimins wird in Kap. IV.2.c.3 diskutiert.

Wie in *E. coli*-AsAT und in Abweichung zu anderen Aminotransferasestrukturen, z.B. *P. denitrificans*-ArAT, liegt die Schiff-Basenbindung nicht in der Ebene des PLP-Pyridiniumrings, sondern steht senkrecht dazu. Diese Anordnung deutet auf eine unprotonierte Schiff'sche Base hin und ist somit eine Folge des in den Kristallisationsansätzen vorherrschenden pH-Wertes.

IV.2.c Reaktionsmechanismus

IV.2.c.1 Historische Entwicklung

1934 wurde erstmals der Begriff "Vitamin B₆" verwendet, um die physiologische Wirkungsweise einer zu diesem Zeitpunkt nicht identifizierten Substanz aus dem Vitamin-B-Komplex zu beschreiben (Györgi, 1934). Aufgrund dieser Charakterisierung gelang es 1938 fünf Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, eine kristalline Substanz zu isolieren, deren Struktur ein Jahr später durch Abbau bzw. Synthese bestimmt werden konnte. Es handelte sich hierbei um 4,5-Di(hydroxymethyl)-3-hydroxy-2-methylpyridin, ein Derivat von PLP, dem der Trivialname Pyridoxin bzw. Pyridoxol gegeben wurde (zusammengefaßt in Wagner & Folkers, 1964).

Etwa zur gleichen Zeit wurde in Moskau der als "Transaminierung" bezeichnete schnelle und reversible Transfer einer Aminogruppe von einem NH₂-Donor auf eine Akzeptor-Oxosäure in Muskelgewebe nachgewiesen. Schon damals wurde vermutet, daß der Transfer nicht direkt stattfindet, sondern daß ein spezifischer Stickstoffakzeptor an der enzymkatalysierten Reaktion beteiligt ist (Braunstein, 1939).

Wenige Jahre später stellte sich im Zuge von Wachstumsstudien an *Streptococcus faecalis* heraus, daß die von Pyridoxin abgeleitete aldehydische Verbindung Pyridoxal sowie das dazu korrespondierende Amin wesentlich aktivere Formen von Vitamin B₆ verkörpern. Dieses Ergebnis legte nahe, daß die Substanz in den Stickstoffmetabolismus involviert ist. Tatsächlich wurde beobachtet, daß die Aminosäure Glutamat beim Erhitzen mit Pyridoxal in α -Ketoglutarat überführt wird. Damit war 1945 ein Zusammenhang zwischen Vitamin B₆ und der Transaminierung hergestellt. Es erwies sich in der Folge, daß die aktivierenden Eigenschaften von Pyridoxal bei getrockneten Zellen verbessert werden, wenn sie zusätzlich mit ATP inkubiert wurden. Dieser Effekt konnte durch die vorherige Phosphorylierung des Pyridoxals mit SOCl₂ und Silberphosphat simuliert werden. Die Position der übertragenen Phosphatgruppe offenbarte

sich jedoch erst, als Experimente mit synthetischem Pyridoxal-5'-Phosphat durchgeführt werden konnten (Übersicht von E.E. Snell in Christen & Metzler, 1985).

Neben der Transaminierung werden von PLP noch andere Umsetzungen wie Razemisierung, α -Decarboxylierung, Aldolspaltung, β - oder γ -Eliminierung und Substitutionen katalysiert. Aus Untersuchungen an nichtenzymatischen Modellsystemen ließ sich bereits 1954 ein genereller Mechanismus für alle diese Reaktionen vorschlagen (Metzler *et al.*, 1954). Die Entdeckung, daß der Kofaktor in PLP-abhängigen Enzymen als Schiff'sche Base gebunden ist (Kent *et al.*, 1958; Hughes *et al.*, 1962) sowie spektroskopische Untersuchungen an PLP und gereinigter Aspartat-Aminotransferase führten Ivanov und Karpeisky 1969 ohne Kenntnis der Enzymstruktur dazu, den Einfluß des Proteins auf den Kofaktor zu beschreiben und daraus Besonderheiten der enzymkatalysierten Transaminierung in einem räumlichen Modell abzuleiten. Viele der von ihnen vorhergesagten Details wurden durch die Aufklärung von AsAT-Strukturen (Borisov *et al.*, 1978; Ford *et al.*, 1980) sowie durch kristallografische Untersuchungen in Anwesenheit substratanaloger Substanzen bestätigt und ergänzt. So wurde beispielsweise die Bewegung der kleinen Domäne bei der Anbindung eines Substratmoleküls sowohl indirekt durch die Reaktivitätsveränderung eines Cysteinrests (Gehring & Christen, 1978) als auch kristallografisch durch Differenzelektronendichtekarten nachgewiesen (Eichele *et al.*, 1979).

IV.2.c.2 Intermediate der Transaminierungsreaktion

Das heute gültige Bild der enzymatischen Transaminierungsreaktion ist in Abb. IV.22 zusammengefaßt (nach Kirsch *et al.*, 1984). Der Verlauf der Reaktion wurde größtenteils aus Experimenten mit Aspartat-Aminotransferasen aufgeklärt, läßt sich aber aufgrund der Ähnlichkeit der Substrate sowie der Konservierung der an der Umsetzung beteiligten Reste in Klasse-I-Aminotransferasen auch auf *T. cruzi*-TAT übertragen.

Der Kofaktor ist anfangs über eine Schiff'sche Basenbindung mit Lys 253 als "internes Aldimin" gebunden. In Analogie zu *E. coli*-AsAT und *P. denitrificans*-ArAT wird angenommen, daß die Doppelbindung nicht protoniert ist. Das Stickstoffatom des Pyridiniumringes hingegen trägt ein Proton und liefert so durch die ionische Wechselwirkung mit Asp 216 einen Beitrag zur Positionierung des Kofaktors. Für das phenolische Sauerstoffatom ist eine negative Ladung anzunehmen. Die zu oxidierende Aminosäure liegt unter physiologischen Bedingungen als Zwitterion vor.

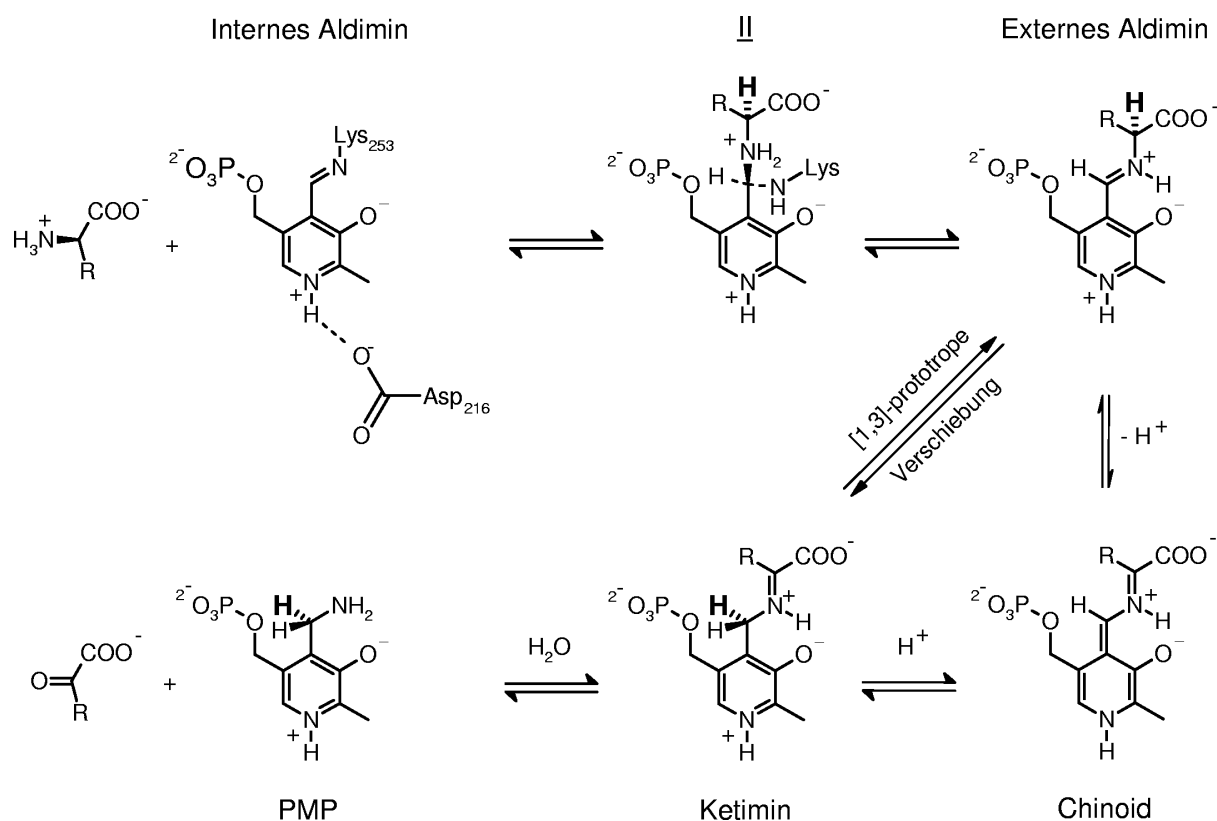


Abb. IV.22: Reaktionsmechanismus der enzymkatalysierten Transaminierung (nach Kirsch *et al.*, 1984). Das transferierte Wasserstoffatom ist in Fettdruck wiedergegeben.

Nach der Anlagerung des Substrats muß seine Aminogruppe zunächst deprotoniert werden. Diese Aufgabe übernimmt das Stickstoffatom der Schiff'schen Base. Hierdurch wird die im internen Aldimin maskierte Carbonylgruppe für einen nukleophilen Angriff aktiviert, während gleichzeitig in der Aminogruppe des Substrats eine starke Nukleophilie erzeugt wird. Es kommt zur Ausbildung eines tetraedrischen Intermediates **II**.

Die aliphatische Seitenkette des Lys 253 übernimmt anschließend ein weiteres Proton von der umzusetzenden Aminosäure. Das nunmehr freie Elektronenpaar des Substrat-Stickstoffatoms verdrängt Lys 253 aus dem tetraedrischen Intermediat und das "externe Aldimin" entsteht. Lys 253 befindet sich aufgrund der Gegebenheiten der Proteinstruktur jetzt auf der Rückseite des Kofaktors in Abb. IV.22.

Im Gegensatz zum internen Aldimin ist die aus Kofaktor und Substrat gebildete Schiff'sche Base protoniert. Die positive Ladung stabilisiert sich durch eine Wasserstoffbrücke zum phenolischen Sauerstoffatom, so daß die Doppelbindung zwischen Stickstoff des Substrats und C4A des Kofaktors in die Ebene des aromatischen Pyridiniumsystems wandert und sich die π -Elektronensysteme konjugieren. Außerdem wird das Stickstoffatom durch die Protonierung

elektrophilisiert. Gleichzeitig steht die σ -Bindung zwischen α -Wasserstoffatom und C α des Aminosäuresubstrats senkrecht zu dem erweiterten delokalisierten π -Elektronensystem. Die σ -Bindung wird hierdurch geschwächt, denn ein Anion an dieser Position kann sich durch Delokalisierung über das gesamte π -Elektronensystem stabilisieren. Zudem übt die positive Ladung am Stickstoffatom des Pyridiniumringes über das delokalisierte System einen Elektronenzug aus. Das Substrat wird durch Wechselwirkung seiner α -Carboxylatgruppe mit Arg 389, das rechts oberhalb der Ringebene von PLP in Abb. IV.22 residiert, relativ zum Kofaktor positioniert. Dadurch, daß es sich bei der α -Aminosäure um eine Verbindung mit L-Konfiguration an C α handelt, liegt ihr H α auf der Unterseite des in Abb. IV.22 gezeigten Pyridoxal-5'-Phosphats in unmittelbarer Nachbarschaft des aufgrund seiner Unprotoniertheit nun stark basischen Lys 253, das zuvor aus der Bindung mit dem Kofaktor verdrängt wurde. Es kommt zur Abstraktion des α -Protons durch diesen Lysinrest, und das externe Aldimin geht in ein chinoides Intermediat über. Wegen der sterischen Umstände im aktiven Zentrum der Aminotransferasen kommen andere Gruppen nicht für die Deprotonierung in Frage.

Durch die Möglichkeit zur Delokalisierung einer negativen Ladung sowie durch die mit Hilfe der Protonierung der beiden Stickstoffatome erzeugte Elektrophilie wird in PLP-Aldiminen jede zum erweiterten π -System senkrecht stehende Bindung destabilisiert. Die Orientierung des Substrats relativ zum Kofaktor entscheidet folglich darüber, ob es sich bei dem Enzym um eine Aminotransferase, eine Decarboxylase oder um ein die Seitenkette des Substrates veränderndes Protein handelt.

Bei Aminotransferasen entsteht durch Reprotonierung des chinoiden Intermediats am exocyclischen Kohlenstoffatom des Kofaktors C4A ein Ketimin. Durch die vorherige Protonenabstraktion und anschließende Protonierung wird also ein Wasserstoffatom vom C α der Aminosäure auf C4A transferiert. Der Vorgang wird als [1,3]-prototrope Verschiebung bezeichnet. Die Reprotonierung an C4A wird ebenfalls von Lys 253 übernommen. Dies konnte durch Experimente mit H α -tritiummarkierten Aminosäuren nachgewiesen werden (Gehring *et al.*, 1984). Möglicherweise wird nur bei einem geringen Teil der Moleküle ein freies Chinoidintermediat durchlaufen, so daß die [1,3]-prototrope Verschiebung in der Hauptsache in einem konzertierten Schritt mit einer verbrückten Lysin-Aminogruppe besteht (Julin & Kirsch, 1989). Erfolgt die Protonenabgabe nicht an C4A sondern stattdessen wieder am C α des Substrats, kann es zur Razemisierung kommen, wenn sich mittlerweile die Ausrichtung des Substrats bzgl. des Kofaktors ändern konnte bzw. wenn deprotonierende und reprotonierende Gruppe nicht identisch sind.

Die abschließende Hydrolyse des Ketimins läßt die zur eingetretenen Aminosäure korrespondierende α -Ketoverbindung entstehen.

Der Kofaktor liegt nach der Hydrolyse als Pyridoxamin-5'-Phosphat (PMP) vor. Durch die

Rückreaktion mit dem zweiten Substrat wird er in die PLP-Form regeneriert. Aufgrund der Doppelfunktion von Lys 253 als deprotonierende und reprotonierende Gruppe sowie der stabilen Orientierung des Substrats ist die zu L-Aminosäuren führende Stereospezifität der Reaktion gewährleistet.

Der Verlauf der Reaktion steht mit dem Ergebnis kinetischer Untersuchungen in Einklang. Diese hatten schon früh gezeigt, daß es sich beim Transaminierungszyklus um einen Ping-Pong Bi-Bi Mechanismus handelt (Velick & Vavra, 1962).

IV.2.c.3 Einfluß des Proteins auf die Transaminierungsreaktion

Für die Transaminierungsreaktion sind mehrere Protonierungsgleichgewichte bedeutsam. Durch die Wechselwirkung von Protein und Kofaktor bzw. Protein und Substrat wird die Lage dieser Gleichgewichte gegenüber derjenigen in freier Lösung so modifiziert, daß die zur PLP-katalysierten Transaminierung führenden Schritte erleichtert werden.

An *T. cruzi*-TAT wurden bisher keine Studien zur Bestimmung von pK_a -Werten durchgeführt. Bei den hier wiedergegebenen Zahlen für enzymgebundenes PLP handelt es sich in der Regel um Ergebnisse von Untersuchungen an *E. coli*-AsAT, deren aktives Zentrum dem von *T. cruzi*-TAT jedoch sehr ähnlich ist (Abb. IV.19). Die aufgeführten Werte sollen lediglich allgemeine Prinzipien und Größenordnungen erläutern.

Aminosäuresubstrat und Internes Aldimin

Der pK_a -Wert der NH_2 -Gruppe von Aminosäuren in wäßriger Lösung liegt zwischen 9 und 10 (Tyrosin: 9.11, Aspartat: 9.82; CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1987). Damit ist unter physiologischen pH-Wert-Bedingungen nur bei einem Bruchteil der Substratmoleküle die für die Transaminierungsreaktion zwingend erforderliche freie Aminogruppe vorhanden.

Bei der Anlagerung im aktiven Zentrum der Aminotransferase wird das Substrat durch die Interaktion seiner α -Carboxylatgruppe mit der Seitenkette von Arg 389 in eine günstige Orientierung relativ zum Kofaktor gebracht. Zweiter Effekt dieser Wechselwirkung ist, daß der pK_a -Wert der Substrat-Aminogruppe durch Annäherung an die positive Ladung von Arg 389 herabgesetzt und somit die Deprotonierung der Aminosäure erleichtert wird. Für Aspartat wird eine Verschiebung des pK_a auf 7.4 geschätzt (Kirsch *et al.*, 1984). Es ist jedoch zu bedenken, daß ein Protonenakzeptor vorhanden sein muß, damit das Proton tatsächlich entfernt werden kann. Wassermoleküle stehen hierfür im aktiven Zentrum von *T. cruzi*-TAT nicht zur Verfügung, und auch die übrigen Gruppen in der Nähe der Bindungsstelle (Seitenketten von Asn 188, Tyr 219, Tyr 345, Tyr 70* und das Carbonylsauerstoffatom von Gly 41) erscheinen für diese Aufgabe ungeeignet. Die Phenolgruppe des Kofaktors ist ebenfalls viel zu sauer, um als Base wirken zu können (Mittelwert von freiem PLP und PMP: pK_a ca. 3.5, für in Wasser gelöste Schiff'sche Basen

sogar -0.84; Christen & Metzler, 1985). Das Wasserstoffbrückengeflecht, in das das Phenolat eingebunden ist, wird die Basizität dieses Ringsubstituenten auch nicht erhöhen. Seine beiden Brückenpartner Asn 188 und Tyr 219 wirken als Wasserstoffdonoren und führen somit eher zu einer Stabilisierung der negativen Ladung am Sauerstoffatom, was einer Azidifizierung gleichkommt.

Es bleibt nur das Stickstoffatom der Schiff'schen Base zwischen Lysin und PLP als Protonenakzeptor. Sein pK_a -Wert muß jedoch durch das Protein sehr stark abgesenkt werden: Für die Modellverbindung aus n-Butylamin und Pyridoxal-5'-Phosphat wurde in wäßriger Lösung ein pK_a -Wert von 12.4 gefunden (in: Christen & Metzler, 1985). Die Bindung von Lys 253 zum Kofaktor wäre demnach wie die umzusetzende Aminogruppe des Substrats protoniert und nicht imstande, das überschüssige Proton zu übernehmen. Für die Reaktion stünde dann nur die wegen der Lage des Säure/Base-Gleichgewichts geringe Zahl unprotonierter Aminosäuremoleküle zur Verfügung. Tatsächlich scheint dieser Reaktionsweg in *E. coli*-AsAT als untergeordnete Alternative zu dem in Abb. IV.22 skizzierten Mechanismus zu existieren (Hayashi & Kagamiyama, 1997), und in der Phosphoserin-Aminotransferase aus dem gleichen Organismus wird er sogar als Haupttroute postuliert (Hester *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu der Modellverbindung aus n-Butylamin und Pyridoxal-5'-Phosphat wurde bei den meisten untersuchten Aminotransferasen mit spektroskopischen Methoden nachgewiesen, daß das interne Aldimin im aktiven Zentrum nicht protoniert ist, da das Proteingerüst den pK_a -Wert um mehrere Einheiten erniedrigt. Für *E. coli*-AsAT wurde z.B. ein pK_a -Wert von 6.8 gemessen (Inoue *et al.*, 1991), und in *E. coli*-ArAT beträgt er 6.65 (Iwasaki *et al.*, 1994). Die bereits erwähnte Phosphoserin-Aminotransferase aus *E. coli* stellt in diesem Punkt eine Ausnahme dar: der pK_a -Wert der Schiff'schen Base liegt hier mit 8.4 erheblich höher (Kallen *et al.*, 1987), so daß das Enzym den alternativen Reaktionsweg über unprotonierte Aminosäuremoleküle einschlagen muß.

Mehrere Mechanismen greifen bei der Aziditätserhöhung des internen Aldimins ineinander: Zunächst ist durch die Wechselwirkung mit Asp 216 die Basizität des Ring-Stickstoffatoms (pK_a des Ringes der oben genannten Modellverbindung in Lösung beträgt demgegenüber 6.53; in: Christen & Metzler, 1985) so stark heraufgesetzt, daß das Atom über den Verlauf der gesamten Reaktion ein Proton trägt. Diese positive Ladung übt, genau wie diejenige des substratbindenden Arg 389, einen destabilisierenden induktiven Effekt auf eine eventuelle positive Ladung an der Aldiminbindung aus. Ein Eingriff in das Stabilisierungssystem der Aspartat-Pyridinium-Wechselwirkung, z.B. durch den Austausch von His 143 gegen Alanin in *E. coli*-AsAT, führt dementsprechend zur Erhöhung des pK_a -Wertes der Schiff'schen Base (Yano *et al.*, 1991). Wird sogar das Aspartat gegen Alanin ausgetauscht, so läßt sich das Stickstoffatom der internen Aldiminbindung über den Bereich von pH 5.3 bis 9.5 nicht mehr titrieren (Yano *et al.*, 1993).

Allerdings sind die induktiven Effekte der positiven Ladungen nicht ausreichend, um alleine die starke Azidifizierung der Schiff'schen Base zu erklären. In anderen Aminotransferaseklassen wie z.B. in Klasse IV, aus der z.B. die angesprochene Phosphoserin-Aminotransferase stammt, werden trotz einer ähnlichen Fixierung des Pyridiniumringes mit einer sauren Proteinseitenkette höhere pK_a -Werte gefunden. Zudem erhöht die Mutation der Arginine im aktiven Zentrum von *E. coli*-AsAT den pK_a -Wert des internen Aldimins nur um 0.7 Einheiten (Kagamiyama *et al.*, 1994).

Ein weiterer wesentlicher Beitrag zur Aziditätserhöhung stammt aus der Fähigkeit der Aminotransferase, Stabilisierungsmechanismen der Protonierung in der freien Schiff'schen Base zu unterdrücken (Hayashi *et al.*, 1998). Die positive Ladung würde normalerweise mit dem phenolischen Sauerstoffatom in Wechselwirkung treten und so auch für eine Koplanarität der C4A-N ζ -Doppelbindung mit dem Aromaten sorgen. Im aktiven Zentrum einer Klasse-I-Aminotransferase kann es zu einer solchen Wechselwirkung nur kommen, wenn sich das Ringsystem des Kofaktors durch Rotation um die Achse durch C2A und C5A oder durch Veränderung der internen Torsionswinkel ϕ und ψ an Lys 253 annähert, denn dessen Seitenkette ist auch in gestreckter Konformation nicht lang genug, um das Stickstoffatom auf die Höhe des Pyridiniumringes zu bringen. Außerdem gehört Lys 253 zur PLP-bindenden Domäne, und diese kann sich nicht relativ zum Kofaktor bewegen. Eine Translation des Pyridiniumringes in Richtung des Lysinrestes ist aufgrund der Verankerung durch Phosphat- und Methylgruppe sowie durch die Wechselwirkungen mit Phe 138 und Ile 218 ebenfalls nicht möglich.

Wegen der starken Wasserstoffbrücken von O3 des PLP mit Asn 188 und Tyr 219 wird der aromatische Ring bei der Drehung um die durch C2A und C5A verlaufende Achse behindert. Infolgedessen verbleibt die Doppelbindung zwischen dem von Lys 253 stammenden Stickstoffatom und C4A des Kofaktors in senkrechter Stellung zum π -System des Kofaktors. Hiermit entfallen nicht nur die internen Stabilisierungsmöglichkeiten für eine protonierte Schiff'sche Base. Gleichzeitig würde ein Proton am Stickstoffatom bei *T. cruzi*-TAT in einer aus Ile 218 und der sich in ekliptischer Konformation befindenden Lys-253-Seitenkette gebildeten hydrophoben Tasche residieren, wodurch die ungünstige Wechselwirkung zwischen einer positiven Ladung und einer unpolaren Oberfläche resultieren würde. Dieser Effekt ist in *T. cruzi*-TAT wahrscheinlich stärker ausgeprägt als in *E. coli*-AsAT und *P. denitrificans*-ArAT, wo der Raum von Ile 218 (*T. cruzi*-TAT) nur durch ein Alanin und ein Serin eingenommen wird und wo die Seitenkette des Lysins außerdem eine gestreckte Konformation besitzt.

Die Bedeutung der beiden Wasserstoffbrücken zum O3 des Kofaktors und die dadurch erzeugte interne Spannung der PLP-Lysin-Schiff'schen Base wird durch die starke pK_a -Erhöhung um fast zwei Einheiten bei Austausch der entsprechenden *E. coli*-AsAT-Reste Asn 194 gegen Alanin und/oder Tyr 225 gegen Phenylalanin unterstrichen (Goldberg *et al.*, 1991; Inoue *et al.*, 1991;

Yano *et al.*, 1993a). Allerdings werden bei diesen Mutanten auch elektronische Effekte diskutiert, denn die Wasserstoffbrücken im Wildtyp-Enzym erniedrigen gleichzeitig die Polarität des Phenolats.

Durch den Vergleich von Strukturen, die bei verschiedenen pH-Werten bestimmt worden sind, lassen sich die Auswirkungen einer Protonierung des internen Aldimins demonstrieren. Die offene Form von *P. denitrificans*-ArAT (1ay4; Okamoto *et al.*, 1998) und von zytosolischer Aspartat-Aminotransferase aus *S. scrofa* (1ajr; Rhee *et al.*, 1997) wurden bei einem pH-Wert unterhalb vom pK_a des internen Aldimins bestimmt. Im aktiven Zentrum beider Proteine liegt die Schiff'sche-Basenbindung fast in der Ebene des aromatischen Systems (kleinster Winkel 6° bei *P. denitrificans*-ArAT, größter 40° in *S. scrofa*-AsAT). Bei Aspartat-Aminotransferase aus Hühnerherzmitochondrien ist ein direkter Vergleich möglich: in der bei pH 7.5 gefundenen Kristallform steht die Doppelbindung senkrecht zum Ring, bei pH 5.1 liegt sie planar (7aat, 8aat; McPhalen *et al.*, 1992). Die Anpassung erfolgt in erster Linie durch Veränderung der Torsionswinkel im Kofaktor (nicht gezeigt).

Insgesamt wird somit deutlich, daß das interne Aldimin bei der hier vorgestellten Struktur von *T. cruzi*-TAT nicht protoniert ist. Dies ist für die bei den Docking-Rechnungen verwendeten Ladungs-Randbedingungen von Bedeutung.

Der pK_a -Wert der Schiff'schen Base wird ebenfalls durch die Anlagerung des Substrats an das aktive Zentrum modifiziert. Durch die Wechselwirkung mit der α -Carboxylatgruppe wird ein Teil der positiven Ladung von Arg 389 kompensiert. Was auf der einen Seite zur Azidifizierung der Substrat-Aminogruppe führt, trägt auf der anderen Seite zur Basizitätserhöhung der Schiff'schen Base bei. In Untersuchungen von Aspartat-Aminotransferasen mit den Inhibitoren Maleat bzw. Succinat wurde eine Verschiebung des pK_a -Wertes um zwei Einheiten beobachtet (Jenkins & D'Ari, 1966; Yano *et al.*, 1993a). Damit wird das interne Aldimin ausreichend basisch, um ein Proton von der gebundenen Aminosäure zu übernehmen, und der Transaminierungszyklus kann beginnen.

Vom Externen Aldimin zum Ketimin

Für die Verbindung aus Aminosäuresubstrat und Kofaktor bestehen die Beschränkungen bezüglich einer Rotation um die C2A-C5A-Achse nicht mehr. Das externe Aldimin hat daher die Möglichkeit, sich ähnlich einer nicht proteingebundenen Modellverbindung aus Pyridoxal-5'-Phosphat und einem Amin zu stabilisieren. Entsprechend werden hier sehr hohe pK_a -Werte gefunden ($pK_a > 10$ bei α -Methylaminosäure/Enzym-Komplexen).

Ein Vergleich der aktiven Zentren von unkomplexierter *E. coli*-AsAT und von durch α -Methyl-

aspartat inhibiertem Enzym (1ars, 1art; Okamoto *et al.*, 1994) zeigt, daß bei der Umsetzung zum externen Aldimin tatsächlich eine Rotation des Kofaktors in Richtung der Substratbindungsstelle und weg vom Lysinrest stattfindet (Abb. IV.23). Gleichzeitig verändern sich die internen Torsionswinkel ϕ und ψ des PLPs. Die Phosphatgruppe sowie der Methylsubstituent des Aromaten verlassen ihre Bindungsstellen nicht, was ihre Ankerfunktion beweist.

Aufgrund der Veränderungen im Kofaktor muß das Substrat seine Position bei der Bildung des externen Aldimins gegenüber dem Enzym/Substrat-Komplex nur wenig ändern. Dies spiegelt sich in einer relativ kleinen Verschiebung der Guanidinogruppe des α -carboxylatbindenden Arginins in *E. coli*-AsAT wieder (Abb. IV.23). Das Arginin gehört zwar zur substratbindenden Domäne, liegt aber in der Nähe der Rotationsachse, die mit dem Übergang von offener zu geschlossener Struktur assoziiert ist. Die Amplitude der Bewegung fällt somit klein aus.

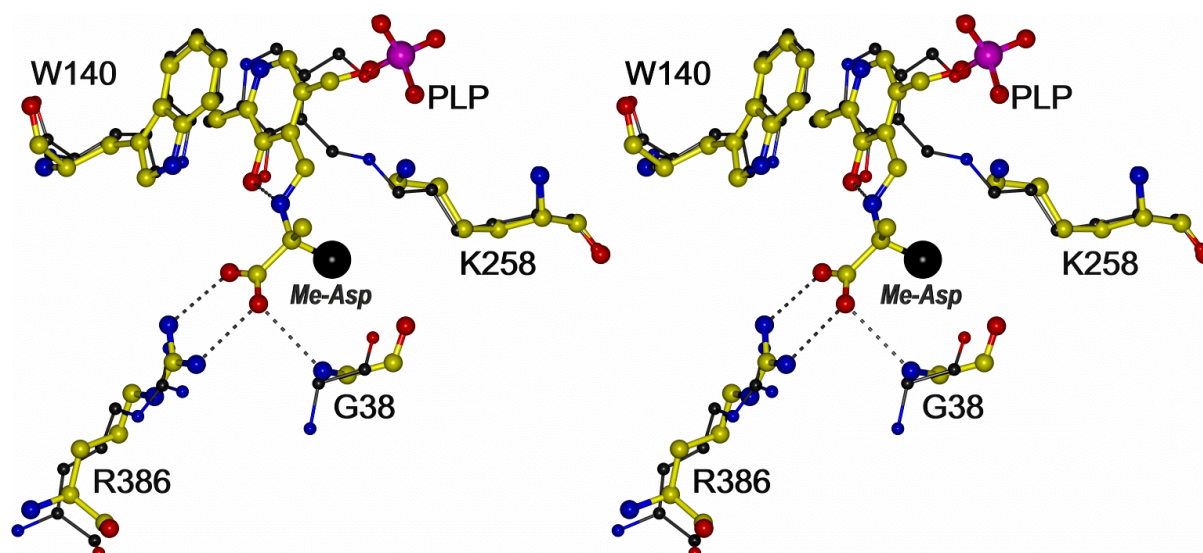


Abb. IV.23: Veränderungen im aktiven Zentrum von *E. coli*-AsAT beim Übergang vom internen (dünne Linien) zum externen Aldimin (1ars, 1art; Okamoto *et al.*, 1994). Der Inhibitor α -Methylaspartat wurde hier an C β trunkiert. Das H α würde unterhalb der Ringebene liegen (vergrößertes Atom).

Durch die Koplanarität von Schiff'scher Basenbindung und aromatischem π -System sowie durch die aus der Wechselwirkung zwischen α -Carboxylatgruppe des Substrats mit Arginin resultierende Orientierung ist im externen Aldimin gewährleistet, daß die nach Abspaltung des α -Protons entstehende negative Ladung senkrecht zum konjugierten π -Elektronensystem steht und sich somit maximal delokalisieren kann.

Wie Experimente mit C α -deutierten Aminosäuren zeigen, ist die nachfolgende [1,3]-prototrope Verschiebung im enzymkatalysierten Transaminierungszyklus teilweise geschwindigkeits-

bestimmend ($k_H/k_D \approx 2.2$). Sowohl in *E. coli*-AsAT (Kuramitsu *et al.*, 1990) als auch in der zu *T. cruzi*-TAT relativ ähnlichen Tyrosin-Aminotransferase aus Ratte (Yu & Nguyen, 1985) werden primäre Isotopeneffekte bei Verwendung von markierten Substraten beobachtet.

Auch in diesen Schritt greift das Proteingerüst modulierend ein. Zum einen wird durch die starke Wasserstoffbrücke zwischen dem protonierten Ringstickstoffatom N1 und Asp 216 (*T. cruzi*-TAT) die richtige Orientierung vom Substrat zum Kofaktor (in diesem Fall verbunden als internes Aldimin) gewährleistet (Yano *et al.*, 1993b), zum anderen wird durch die Wechselwirkung mit der negativen Ladung der Seitenkette die Protonierung des Kofaktors an N1 überhaupt ermöglicht. Erst diese positive Ladung versetzt das PLP in die Lage, effektiv als Elektronensenke zu fungieren (Yano *et al.*, 1992). Durch die hieraus resultierende Beschleunigung der Deprotonierung an C α wird dieser Teilschritt innerhalb des kompletten Reaktionsgeschehens anders gewichtet, wie aus dem erheblich größeren primären Isotopeneffekt von $k_H/k_D \approx 6.7$ bei nicht protoniertem Kofaktor in einer D222A-Mutante von *E. coli*-AsAT ersichtlich wird. Ein primärer Isotopeneffekt in dieser Größe zeigt an, daß die [1,3]-prototrope Verschiebung bei dem veränderten Enzym die Geschwindigkeit alleine bestimmt (Cornish-Bowden, 1995). Weitergehende Studien deuten auf eine Funktion des Aspartats bei den mit der Umsetzung einhergehenden Konformationsänderungen des Enzyms hin (Onuffer & Kirsch, 1994). Auf die doppelte Funktion des PLP-bindenden Lysins wurde bereits hingewiesen. Es ist wahrscheinlich, daß die Aminogruppe dieses Restes durch eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette von Tyr 71* in der richtige Position für die Reprotonierung des Chinoidintermediates gehalten wird (Birolo *et al.*, 1994).

Hydrolyse des Ketimins und PMP-Form

Die abschließende Hydrolyse des Ketimins wird ebenfalls durch Lys 253 katalysiert. Die Seitenkette dieses Restes ist nach der Protonenabgabe an C4A des Kofaktors wieder ungeladen und somit sehr basisch. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um das hydrolysierende Wassermolekül zu deprotonieren. Das zweite H₂O-Proton wird vom Kofaktor übernommen. Wie kristallografische Studien an *E. coli*-AsAT zeigen, liegt die PMP-Aminogruppe anschließend fast koplanar zum aromatischen System des Kofaktors und bildet gleichzeitig eine Wasserstoffbrücke zur ϵ -Aminogruppe des kofaktorbindenden Lysins (1amq, Miyahara *et al.*, 1994). Durch diese Wechselwirkung wird gewährleistet, daß sich der Lysinrest in einer optimalen Orientierung für die Protonierung der α -Ketogruppe des zweiten Substrats befindet. Nach Übertragung der Ladung auf die α -Ketoverbindung ist sowohl die Aminogruppe des Kofaktors als auch die des katalytischen Lysins unprotoniert, doch nur die PMP-NH₂-Funktion liegt dicht genug, um mit dem oxidierenden Substrat zu einer Ketiminverbindung zu kondensieren. Experimente in D₂O zeigen, daß die Hydrolyse die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion ebenfalls mitbestimmt, so

daß davon ausgegangen werden kann, daß [1,3]-prototrope Verschiebung und Hydrolyse etwa die gleiche Aktivierungsenergie besitzen (Goldberg & Kirsch, 1996).

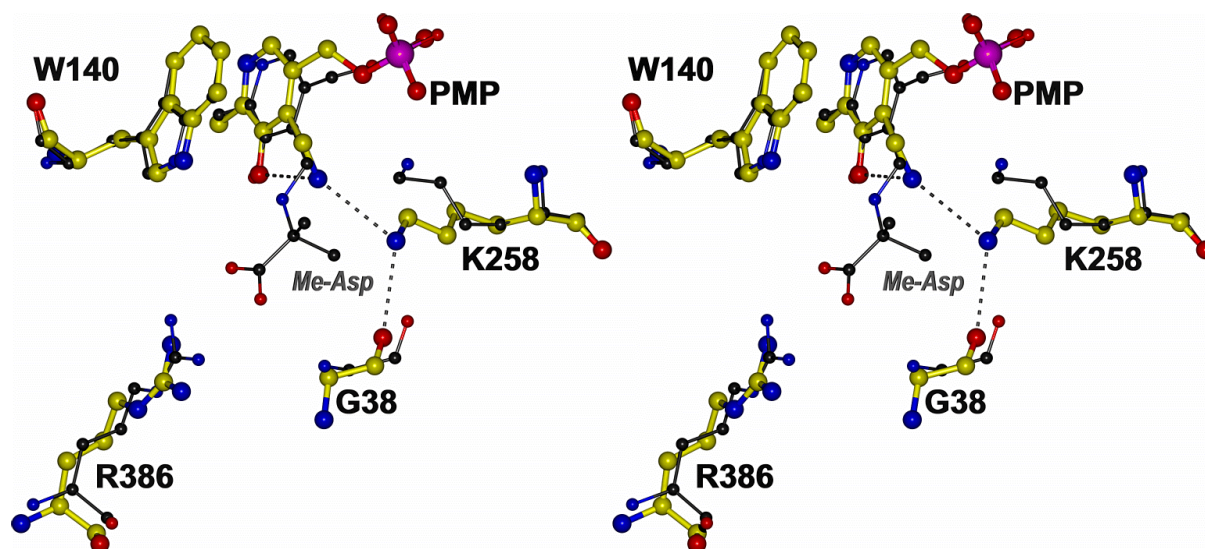


Abb. IV.24: Überlagerung der PMP-Form (1amq; Miyahara *et al.*, 1994) mit der α -methyl-aspartat-inhibierten Struktur von *E. coli*-AsAT (dünne Linien; 1art; Okamoto *et al.*, 1994).

IV.2.d Substratspezifität

T. cruzi-Tyrosin-Aminotransferase kann die drei natürlichen aromatischen Aminosäuren effektiv oxidieren. Wie sich aus den kinetischen Parametern ablesen läßt (Tab. IV.7), ist Tyrosin dabei das bevorzugte Substrat (Montemartini *et al.*, 1993). Alanin besitzt eine vergleichbare hohe Affinität, und auch Methionin wird mit guter Effizienz umgesetzt. Auf der anderen Seite sind Aspartat sowie hydrophobe Aminosäuren mit verzweigten Seitenketten (Leucin, Isoleucin und Valin) extrem schlechte Substrate des Enzyms (Nowicki *et al.*, 1992; Nowicki, 1999).

Für die zweite Halbreaktion im Transaminierungszyklus benötigen Klasse-I-Aminotransferasen eine α -Ketocarbonsäure. In der Regel wird hier α -Ketoglutarat verwendet. Eine NADH-abhängige Dehydrogenase oxidiert das aus der Transaminierung stammende Glutamat anschließend wieder zu α -Ketoglutarat und Ammoniak. Letzteres wird zu Harnstoff umgesetzt und ausgeschieden. α -Ketoglutarat dient somit als Transportmolekül im Stickstoffmetabolismus. Auch die Tyrosin-Aminotransferasen von Mensch und Ratte arbeiten entsprechend ihrer im Aminosäureabbau anzusiedelnden Funktion am besten mit α -Ketoglutarat als reoxidierender Substanz (Tab. IV.8; Iwasaki *et al.*, 1973; Andersson & Pispä, 1982).

Im Gegensatz dazu ist bei *T. cruzi*-TAT das nur mit einer Carboxylatfunktion ausgestattete Pyruvat das am stärksten bindende Molekül, so daß wahrscheinlich Tyrosin und Pyruvat das

natürliche Substratpaar des Enzyms bilden (Montemartini *et al.*, 1993). Ebenfalls als gutes Substrat erweist sich das zu Methionin transaminierbare α -Ketomethiobutyrat (KTMB; Nowicki, 1999). In dieser Beobachtung spiegelt sich die Tatsache wieder, daß der Metabolismus des Parasiten keinen Harnstoffzyklus enthält und die metabolische Funktion der *T. cruzi*-TAT an anderer Stelle anzusiedeln ist. Die starke Bevorzugung von Pyruvat vor Oxaloacetat korrespondiert mit der Unfähigkeit des Proteins, Aspartat zu transaminieren.

Substrat	Kosubstrat	app. K_m (mM)	app. V_{max} (u/mg)
Tyrosin	Pyruvat (6 mM)	7.1 ± 0.4	129.3 ± 5.3
Phenylalanin	“	20.1 ± 5.8	157.7 ± 41.4
Tryptophan	“	26.7 ± 1.4	73.3 ± 3.6
Alanin	α -Ketoglutarat (20 mM)	5.7 ± 0.4	132.9 ± 2.7
Pyruvat	Tyrosin (5 mM)	0.7 ± 0.1	181.4 ± 18.7
Oxaloacetat	“	19.2 ± 4.0	134.7 ± 17.3
α -Ketoglutarat	“	38.7 ± 2.1	33.4 ± 1.2

Tab. IV.7: Kinetische Konstanten für einige Substrate von *T. cruzi*-TAT (Montemartini *et al.*, 1993)

Substrat	Kosubstrat	rel. Aktivität (%)
Tyrosin	α -Ketoglutarat	100
“	Oxaloacetat	13
“	Pyruvat	43
Phenylalanin	α -Ketoglutarat	38
Tryptophan	“	5

Tab. IV.8: Kinetische Konstanten von Ratten-TAT (Iwasaki *et al.*, 1973)

Die bakteriellen Enzyme *E. coli*-AsAT und *P. denitrificans*-ArAT unterscheiden sich in ihrem Verhalten stark von der Dreiergruppe der Tyrosin-Aminotransferasen aus *T. cruzi*, Mensch und Ratte. *E. coli*-AsAT kann mit geringer Effizienz Tyrosin oxidieren, während Aspartat und α -Ketoglutarat eindeutig ihre bevorzugten Substrate sind (Kuramitsu *et al.*, 1990). *P. denitrificans*-

ArAT ist demhingegen in der Lage, Aspartat mit fast den gleichen kinetischen Parametern umzusetzen wie aromatische Substrate (Oue *et al.*, 1997). Aus der schlechten Bindung von Alanin läßt sich schließen, daß bei diesen beiden Proteinen Bicarboxylatverbindungen bei der Regenerierung des Kofaktors bevorzugt werden (Tab. IV.9 und Tab. IV.10).

Substrat	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}} / K_{\text{m}}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Aspartat	550	45	120000
Glutamat	700	38	18000
Tyrosin	k.S.	k.S.	-
Alanin	k.S.	k.S.	-
Oxaloacetat	800	35	23000000
α -Ketoglutarat	600	13	18000

Tab. IV.9: Kinetische Konstanten von *E. coli*-AsAT (Kuramitsu *et al.*, 1990). k.S.: keine Sättigung

Substrat	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}} / K_{\text{m}}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Aspartat	320 ± 20	1.6 ± 0.2	200000
Glutamat	2000 ± 40	95 ± 3	21000
Tyrosin	1100 ± 140	2.9 ± 0.5	390000
Alanin	k.S.	k.S.	-
Oxaloacetat	1200 ± 20	0.035 ± 0.003	34000000
α -Ketoglutarat	1700 ± 80	2.3 ± 0.22	740000

Tab. IV.10: Kinetische Konstanten von *P. denitrificans*-ArAT (Oue *et al.*, 1997)

E. coli-AsAT und *P. denitrificans*-ArAT besitzen an Sequenzposition 292 ein Arginin, dessen Guanidinogruppe mit der zweiten Carboxylatgruppe des Substrats in Wechselwirkung treten kann (Abb. IV.25, Abb. IV.26). In *P. denitrificans*-ArAT wird durch die Seitenkettenkonformation dieses Arg 292 und weiterer Reste die Bindungsstelle an die Seitenkette des jeweiligen Substrats angepaßt (Abb. IV.26, Abb. V.27; Okamoto *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 1999).

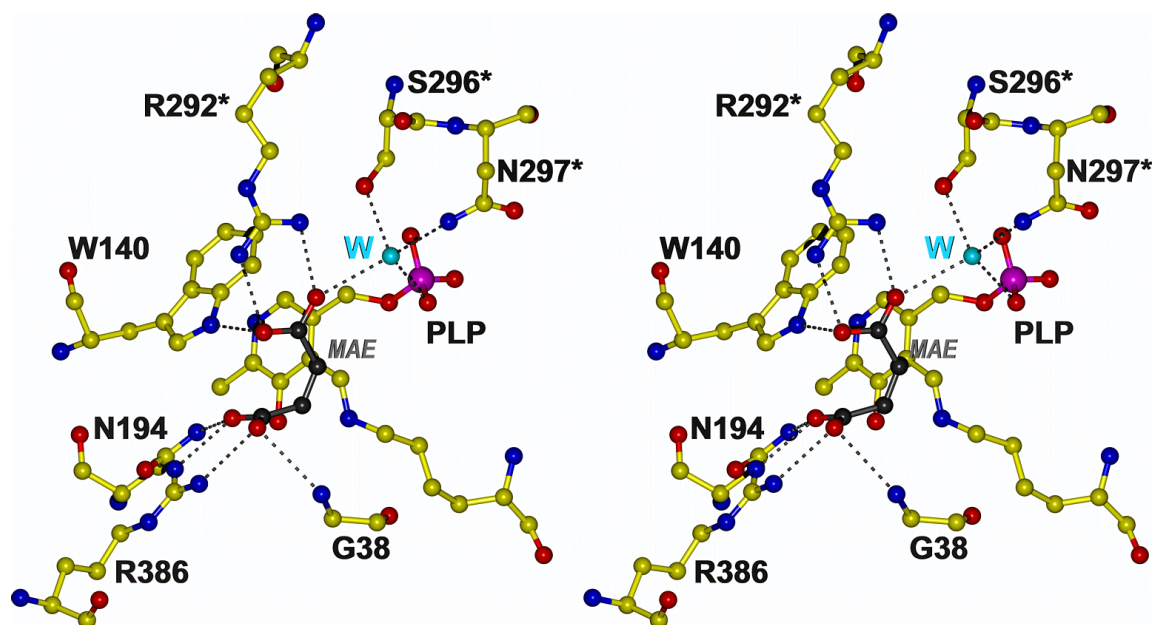


Abb. IV.26: Maleatbindung (MAE) in *E. coli*-AsAT (1asm; Jäger *et al.*, 1994)

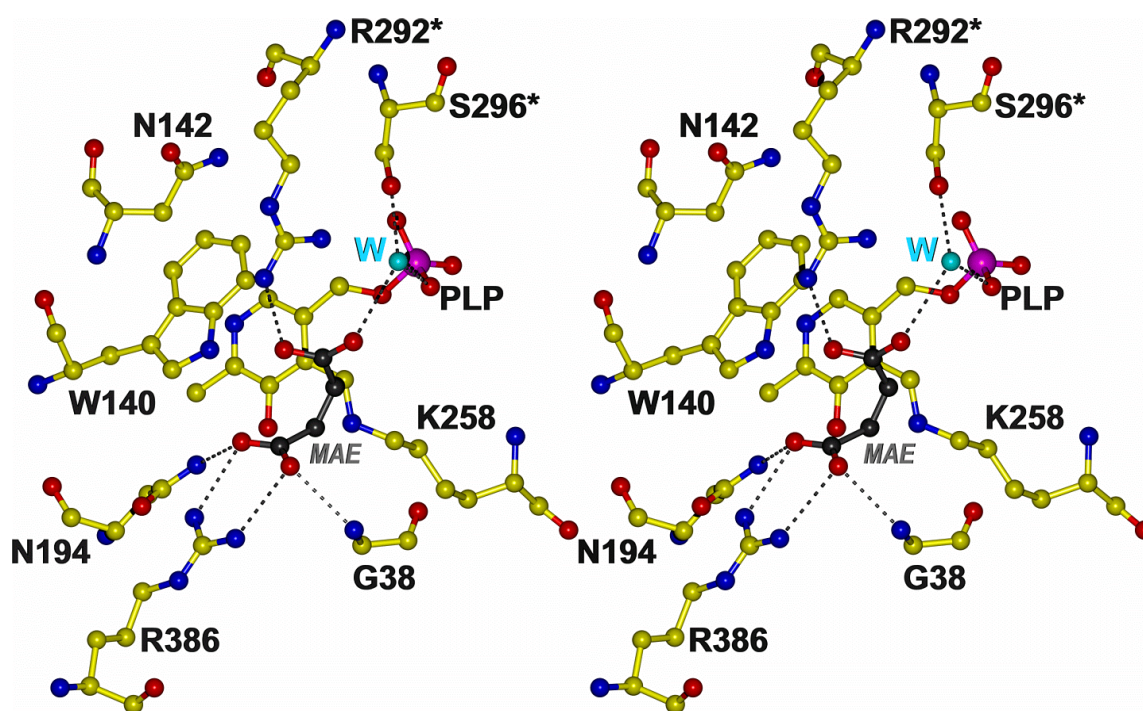


Abb. IV.25: Maleatbindung in *P. denitrificans*-ArAT (1ay5; Okamoto *et al.*, 1998)

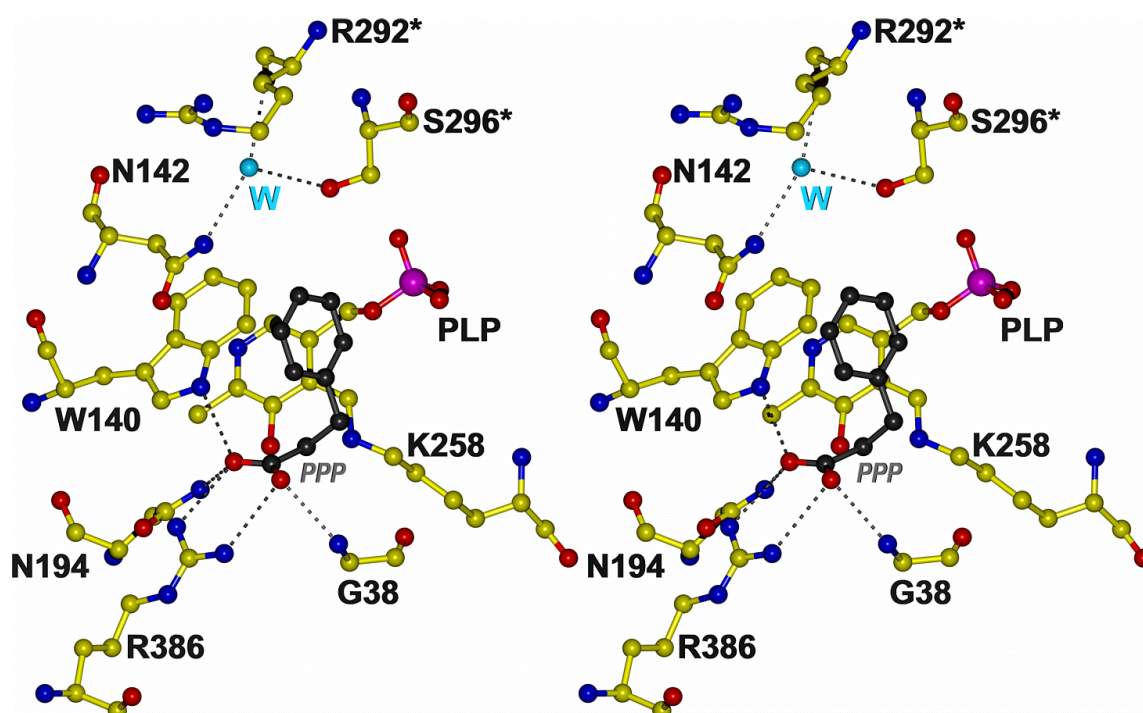


Abb. IV.27: Phenylpropionat (PPP) in *P. denitrificans*-ArAT (1ay8; Okamoto *et al.*, 1998)

Die effektive Diskriminierung von Aspartat in *T. cruzi*-TAT ist zunächst überraschend, denn sterische Gründe können hier kaum eine Rolle spielen. Das Enzym besitzt ein sehr großes aktives Zentrum von etwa 9 Å Weite und 11 Å Tiefe (Abb. IV.28). Aspartat hat einen geringeren Raumbedarf als Tyrosin und besteht zudem an den äquivalenten Positionen aus Atomen mit gleicher Hybridisierung.

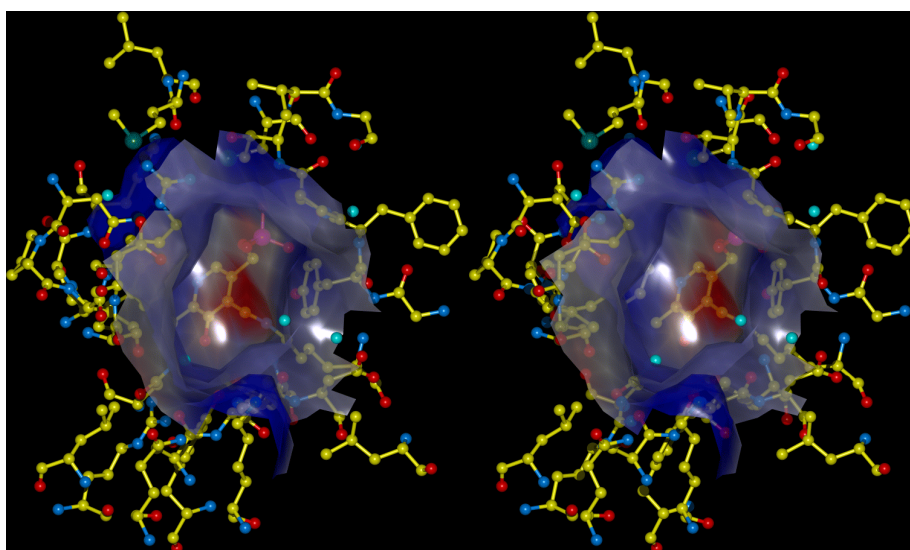


Abb. IV.28: Oberfläche am aktiven Zentrum A von *T. cruzi*-TAT

Um die molekularen Erkennungsmechanismen von *T. cruzi*-TAT auf der Grundlage experimenteller Daten zu verstehen, wurden Kristalle mit ungelöstem D/L- α -Methyltyrosin bzw. D/L- α -Methylmethionin versetzt. In den mit den zugehörigen Daten berechneten Elektronendichtekarten ist jedoch kein gebundener Inhibitor zu erkennen. Vielmehr zeigt sich auch hier wieder das Bild des unkomplexierten Enzyms mit einer senkrecht stehenden Schiff'schen-Basenbindung zwischen Lys 253 und PLP.

Die Gründe für das Scheitern dieser Experimente sind unklar. Es besteht die Möglichkeit, daß Affinität und Löslichkeit der beiden Inhibitoren für eine Absättigung der Bindungsstellen unter den gegebenen Bedingungen nicht ausreichen. Die Bindungskonstanten für die Substrate der verwandten TAT aus Ratte liegen lediglich im millimolaren Bereich, während der Kofaktor eine etwa 10^3 -fach höhere Affinität aufweist (Iwasaki *et al.*, 1973). PLP ist in den Kristallisationstropfen in 5 millimolarer Konzentration anwesend, so daß gebildetes externes Aldimin möglicherweise sofort wieder durch den freien Kofaktor verdrängt wird. Die Experimente anderer Autoren unterstützen dieses Argument. So wurde z.B. zur Erzeugung eines Komplexes aus α -Methylaspartat und *E. coli*-AsAT eine Inhibitorkonzentration von 170 mM verwendet (Okamoto *et al.*, 1994). Dieser Wert läßt sich mit den eingesetzten *T. cruzi*-TAT-Inhibitoren nicht erreichen.

Zusätzlich ist die Affinität des Enzyms für die Inhibitoren möglicherweise durch Kristallpackungseffekte behindert. Bei Aminotransferasen der Klasse I geht die Struktur bei Anbindung eines Substrats durch Bewegung der kleinen Domäne von der offenen in eine geschlossene Konformation über. Ein solcher Mechanismus ist auch für *T. cruzi*-TAT zu erwarten (s. Kap. IV.2.a.4). In der hier untersuchten Kristallform des Proteins existieren Kontakte zwischen der substratbindenden Domäne im Monomer A (Pro 30 bis Pro 34) zur substratbindenden Domäne von Monomer B des kristallografisch benachbarten Moleküls (eine flache Kluft aus den Bereichen Pro 34 bis Ile 36 und Pro 395 bis Arg 405 in Helix $\alpha 15$). Folglich können sich weder das aktive Zentrum von Monomer A noch das von Monomer B unbehindert schließen.

Eine Abschirmung des aktiven Zentrums durch Kristallkontakte ist für den Mißerfolg der Komplexierungsversuche nicht verantwortlich. Die Reinspektion des Schwermetallderivatdatensatzes zeigt deutlich die Anwesenheit von Quecksilberatomen an der Thiolgruppe von C289 (Abb. IV.28). Diese Aminosäure ist von außen nur über den Substrateintrittskanal am aktiven Zentrum zugänglich. Eine Kristallpackungsanalyse zeigt außerdem, daß das aktive Zentrum auf Seiten der Lösungsmittelkanäle im Kristall liegt (nicht gezeigt).

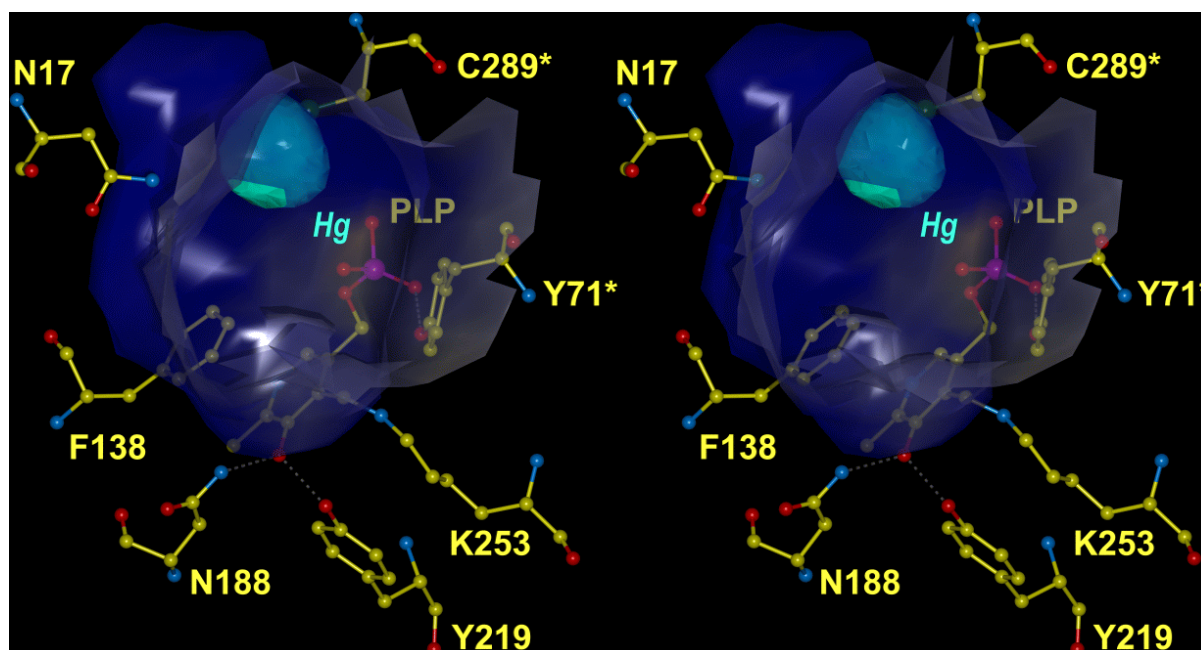


Abb. IV.29: Differenzelektronendichte an C289* bei 4σ . Die Oberfläche zeigt den Eingang zum aktiven Zentrum der *T. cruzi*-TAT. Die Stärke des Signals für das Quecksilberatom (hellgrün) im Vergleich zu den stärksten Wassermolekülen zeigt an, daß die Hg-Absättigung ca. 50% beträgt.

Um dennoch Aussagen über die Substratbindung und Spezifität des Enzyms machen zu können, wurden Docking-Simulationen mit dem in Kap. III beschriebenen Ansatz durchgeführt. Zur Interpretation der Ergebnisse muß bedacht werden, daß die verwendeten Computerprogramme Veränderungen in der Proteinstruktur, die durch Anbindung des Substrats induziert werden, nicht berücksichtigen.

Zusätzlich zu den Simulationen wurden anhand von AsAT-Inhibitor-Komplexen aus der Strukturdatenbank Modelle für Reaktionsintermediate der *T. cruzi*-TAT-katalysierten Transaminierung erstellt.

IV.2.d.1 Präferenz für Tyrosin

Die Docking-Rechnungen zeigen, daß die drei aromatischen Aminosäuren leicht in das große aktive Zentrum der *T. cruzi*-TAT eingepaßt werden können. Der hypothetische Komplex mit der niedrigsten Energie besitzt dabei stets die richtige Orientierung des Substrats in Bezug auf den Kofaktor: die beiden Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe formen Salzbrücken mit der Guanidinogruppe von Arg 389, zusätzlich bildet das proximal zu PLP liegende Sauerstoffatom eine Wasserstoffbrücke zu Nδ2 von Asn 188 und das distale Sauerstoffatom eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom von Gly 41. Dieses Wechselwirkungsmuster wird auch im experimentellen Komplex von *E. coli*-AsAT mit dem substratanalogen Maleat beobachtet (Abb.

IV.26; Jäger *et al.*, 1994). Die α -Aminogruppe wird in den Simulationen so platziert, daß es als Wasserstoffdonor für das Carbonylsauerstoffatom von Gly 41 und O η von Tyr 345 dient. Dieses Ergebnis läßt sich nicht durch den Vergleich mit bekannten Strukturen verifizieren, da in der Strukturdatenbank zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Frühjahr 1999) keine Michaelis-Menten-Komplex-artigen Strukturen für eine Aminotransferase mit einem Aminosubstrat bzw. einem Analogon existieren.

Die berechnete optimale Orientierung von Tyrosin im aktiven Zentrum von *T. cruzi*-TAT ist in Abb. IV.30 gezeigt.

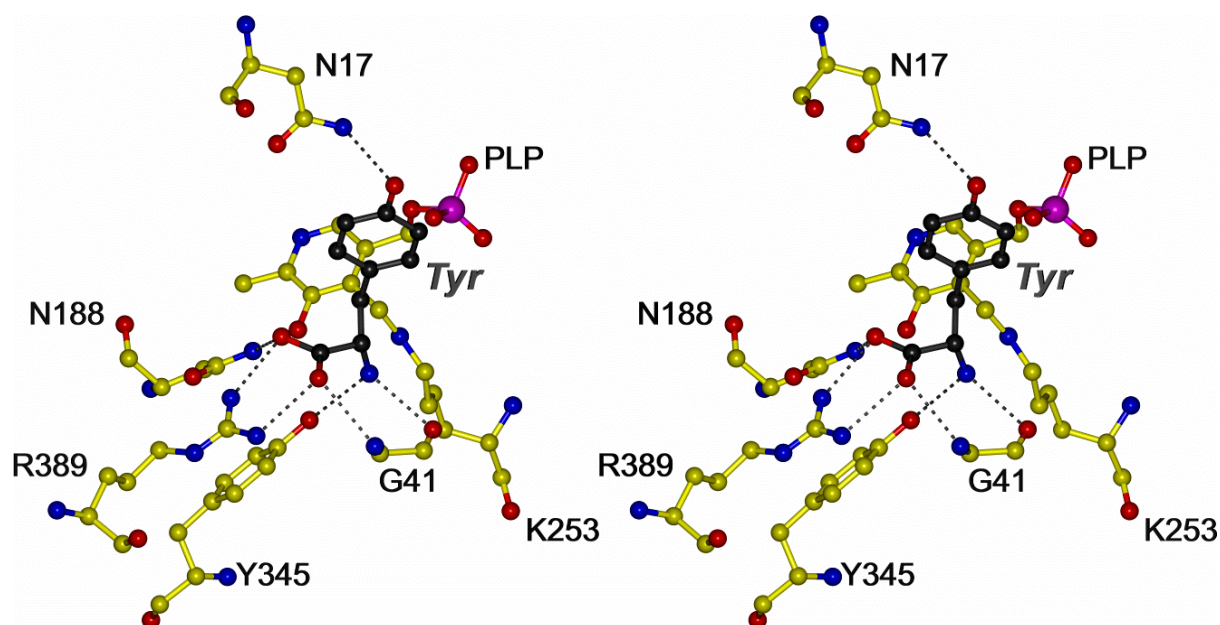


Abb. IV.30: Hypothetischer Enzym-Substratkomplex für Tyrosin (dunkelgrau) und *T. cruzi*-TAT

Aufgrund seiner phenolischen Hydroxygruppe ist Tyrosin in der Lage, im hypothetischen Enzym-Substrat-Komplex eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit Asn 17 von Monomer A zu bilden. Die Docking-Rechnungen führen die Seitenkette von Tyrosin daher häufiger in die gleiche Position als die von Phenylalanin oder Tryptophan. Eine Wasserstoffbrücke zu Asn 17 liefert demnach eine plausible Erklärung für die unterschiedliche Affinität der aromatischen Aminosäuren. Das Asparagin ist auch in den Tyrsosin-Aminotransferasen von Mensch und Ratte konserviert.

Abb. IV.31 vermittelt einen Eindruck über die Größenverhältnisse und Orientierung verschiedener Substrate im aktiven Zentrum der *T. cruzi*-TAT. Durch die negativen Ladungen am phenolischen Sauerstoffatom und der Phosphatgruppe des Kofaktors wird an der Position von

C4A, der Reaktionsstelle der Transaminierung, ein negatives Potential erzeugt, das sich zur Anziehung der positiven Ladung an der Aminogruppe des Substrats eignet. Die aromatischen Seitenketten liegen vor (Tyrosin) oder innerhalb einer Tasche (Tryptophan), die sich in einer geschlossenen Konformation des Enzyms als tatsächlicher Aufenthaltsort der Substratseitenkette erweisen könnte.

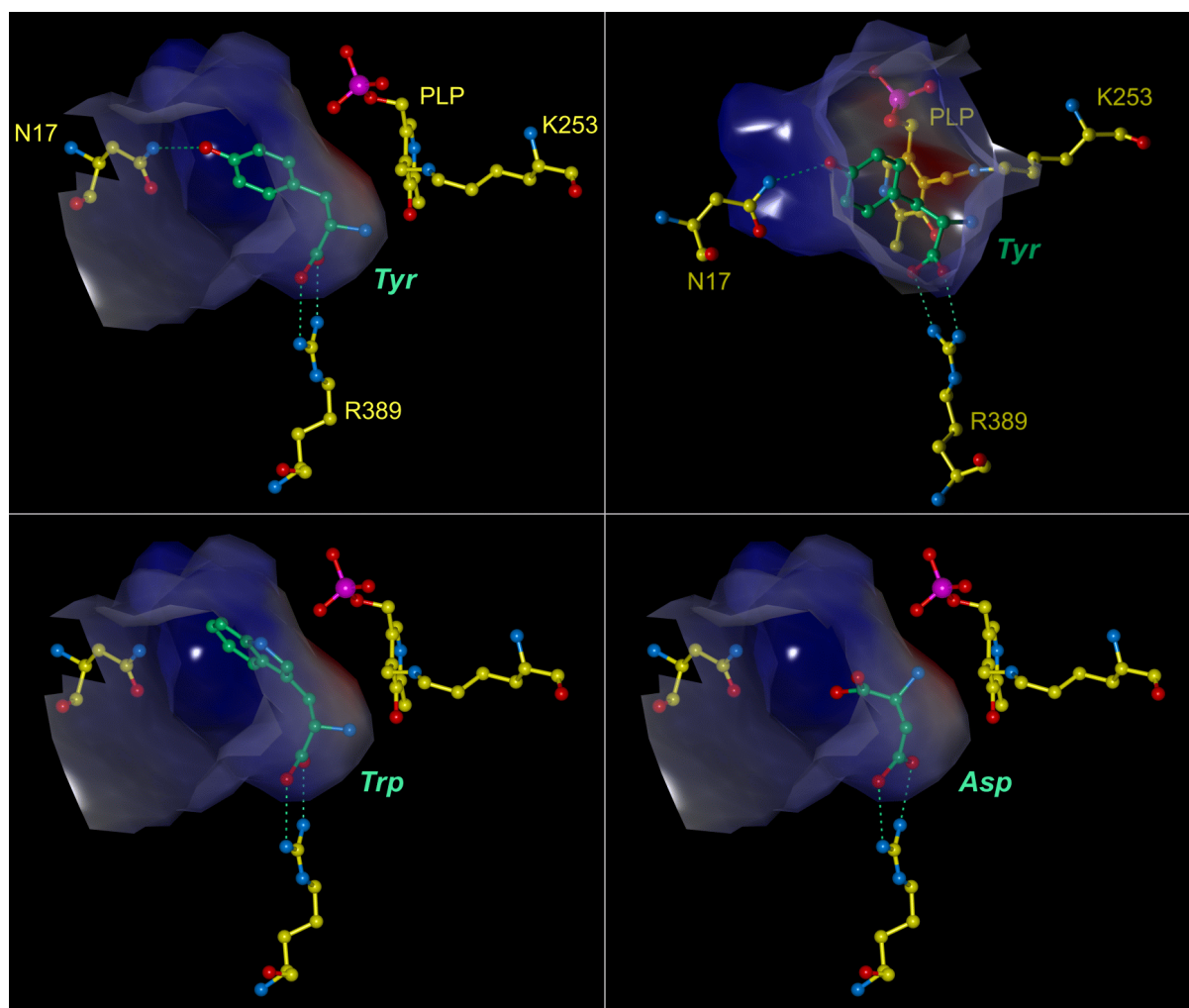


Abb. IV.31: Hypothetische Komplexe mit Tyrosin (oben), Tryptophan (unten links) und Aspartat (unten rechts)

Aspartat und Glutamat zeigen in den Simulationen ein abweichendes Anlagerungsmuster. In der bevorzugten Orientierung bildet Arg 389 eine ionische Wechselwirkung mit der β - bzw γ -Carboxylatgruppe dieser Aminosäuren, nicht mit der α -Carboxylatgruppe wie bei den übrigen Substraten. Die positiv geladene Aminogruppe wird hier durch Wechselwirkung mit dem Kofaktor-Phosphat und nicht mit Tyr 345 und Gly 41 stabilisiert. In einer derartigen Anordnung kann die Transaminierungsreaktion nicht nach dem oben beschriebenen Mechanismus ablaufen:

Zwar lassen die Abstände zwischen Aminogruppe und Kofaktor eine Reaktion nicht unmöglich erscheinen, aber aufgrund der L-Konfiguration am C α liegt das in der [1,3]-prototropen Verschiebung zu übertragene H α hier nicht auf der Seite von Lys 253, so daß diese Aminosäure nicht katalysierend wirken kann. Die "Kopfüber"-Orientierung ist eine Folge des Ladungsverhältnisses zwischen α - und β - bzw. γ -Carboxylatgruppe. Infolge der größeren Entfernung zur positiv geladenen Aminogruppe liefern die Orbitalverfahren bei der Ladungsberechnung für die β - bzw. γ -Position einen stärker negativen Wert, so daß eine erhöhte Affinität zu Arg 389 entsteht. Zudem besitzt *T. cruzi*-TAT nicht wie *E. coli*-AsAT oder *P. denitrificans*-ArAT ein zweites substratbindendes Arginin, das die korrekte Orientierung von Dicarboxylatverbindungen gewährleisten könnte.

Inwieweit Aspartat oder Glutamat als kompetitive Inhibitoren wirken können, ist noch nicht eingehend untersucht.

IV.2.d.2 Diskriminierung von Dicarboxylatverbindungen und Aminosäuren mit verzweigter Seitenkette

Aus dem Enzym-Substrat-Komplex entsteht über ein tetraedrisches Intermediat das externe Aldimin aus Substrat und Kofaktor. Auf Grundlage der α -Methylaspartat-inhibierten Struktur von *E. coli*-AsAT (Okamoto *et al.*, 1994) läßt sich zeigen, daß die Wasserstoffbrücke zwischen der Tyrosinseitenkette und Asn 17 in dieser Zwischenstufe bei *T. cruzi*-TAT weiterbestehen kann (Abb. IV.32). Im Vergleich zum hypothetischen Michaelis-Menten-Komplex müssen sich hierfür allerdings die Torsionswinkel ψ und χ_1 innerhalb des Substratmoleküls stark ändern, denn in der in Abb. IV.30 gezeigten Konformation steht die Bindung zwischen C α und der Aminogruppe noch senkrecht zum Pyridiniumring, während im internen Aldimin eine Koplplanarität erwartet wird.

Aus der in Abb. IV.32 gezeigten Überlagerung des aus der Röntgenstruktur von inhibierter *E. coli*-AsAT entnommenen externen Aldimins (Okamoto *et al.*, 1994) mit dem Kofaktor aus *T. cruzi*-TAT wird ein wahrscheinlicher Grund für das unterschiedliche Verhalten der beiden Enzyme gegenüber Dicarboxylatverbindungen deutlich. Während die Position des Kofaktorrings in beiden Strukturen praktisch identisch ist, liegt die Phosphatgruppe in *T. cruzi*-TAT in Richtung der Substratbindungsstelle verschoben. Die negativ geladene Seitenkette einer sauren Aminosäure würde daher innerhalb eines externen Aldimins bei gleicher Konformation wie in der *E. coli*-AsAT-Struktur eine sehr starke Abstoßung erfahren, denn der Abstand zur nur teilweise kompensierten doppelt negativen Ladung der Phosphatgruppe wäre extrem klein ($d < 2.5 \text{ \AA}$). Für Aspartat existiert kaum eine Möglichkeit, dieser ungünstigen Wechselwirkung zu entgehen. Die Orientierung der C α -H α -Bindung ist durch den Katalysemechanismus vorgegeben, so daß sich eine Vermeidung der Abstoßung nur durch die Anpassung der Torsions-

winkel in der Seitenkette ergeben kann. Wird diese jedoch in Abb. IV.32 mit dem Uhrzeigersinn um χ_1 rotiert, so kommt es zu sterischen Konflikten mit der Seitenkette von Tyr 71*, während in der anderen Drehrichtung die negative Ladung der eigenen α -Carboxylatgruppe die Bewegungsfreiheit einschränkt.

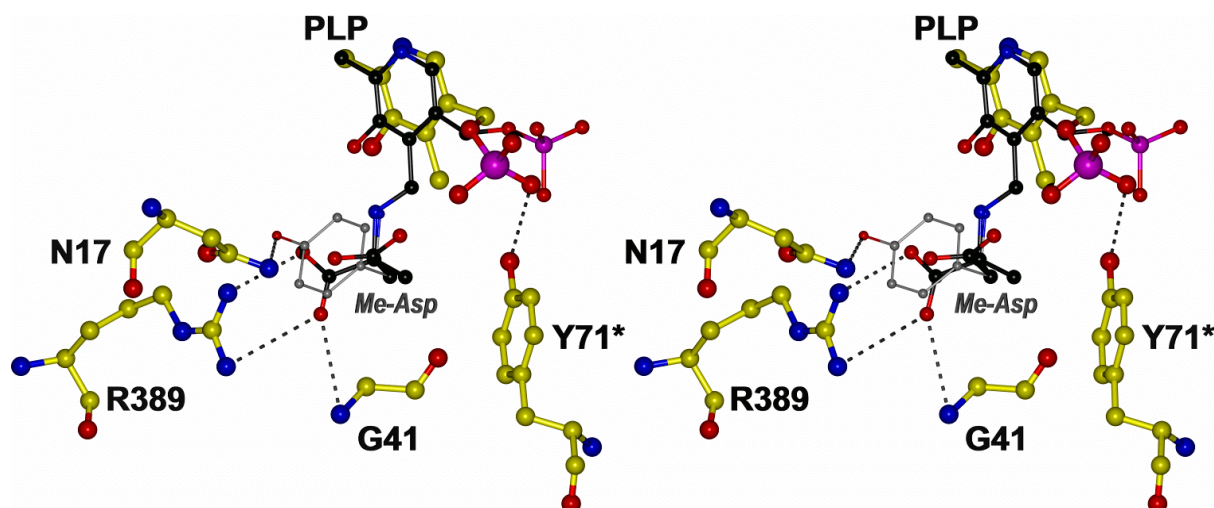


Abb. IV.32: Überlagerung des durch α -Methylaspartat inhibierten Kofaktors aus *E. coli*-AsAT (dunkelgrau, 1art; Okamoto *et al.*, 1994) mit einigen Aminosäuren des aktiven Zentrums von *T. cruzi*-TAT. Während in einem externen Aldimin bzw. dem Ketiminintermediat mit Tyrosin eine Wasserstoffbrücke von O η zu Asn 17 bestehen kann (hellgrau, dünne Linien), würde die β -Carboxylatgruppe von Aspartat in engen Kontakt zur Phosphatgruppe des Kofaktors geraten.

Strukturelle Gründe für die abweichende Bindung der Phosphatgruppe wurden in Kap. IV.2.b erläutert. Es ist nicht davon auszugehen, daß sie ihre Lage im Laufe der Reaktion ändert, denn sie ist in ein stabiles Wasserstoffbrückengeflecht eingebunden und dient demnach wie in verwandten Enzymen als Anker des Kofaktors. Die Position, die in den bakteriellen Enzymen gefunden wird, ist dem Phosphat in *T. cruzi*-TAT aufgrund der höheren Hydrophobizität an der entsprechenden Koordinaten verwehrt.

Auch die Plazierung einer Glutamatseitenkette ist in einem externen Aldimin von *T. cruzi*-TAT schwierig. In der K258H-Mutante von mitochondrialer Aspartat-Aminotransferase zeigt sich, daß das Glutamat bei diesen Enzymen im Aldimin mit PLP eine ungünstige interne Geometrie annimmt, um eine Salzbrücke zu Arg 292 zu realisieren (Malashkevich *et al.*, 1995). In dieser Konformation ergeben sich wieder die gleichen Konflikte mit der negativen Ladung des Phosphats wie für Aspartat (Abb. IV.33).

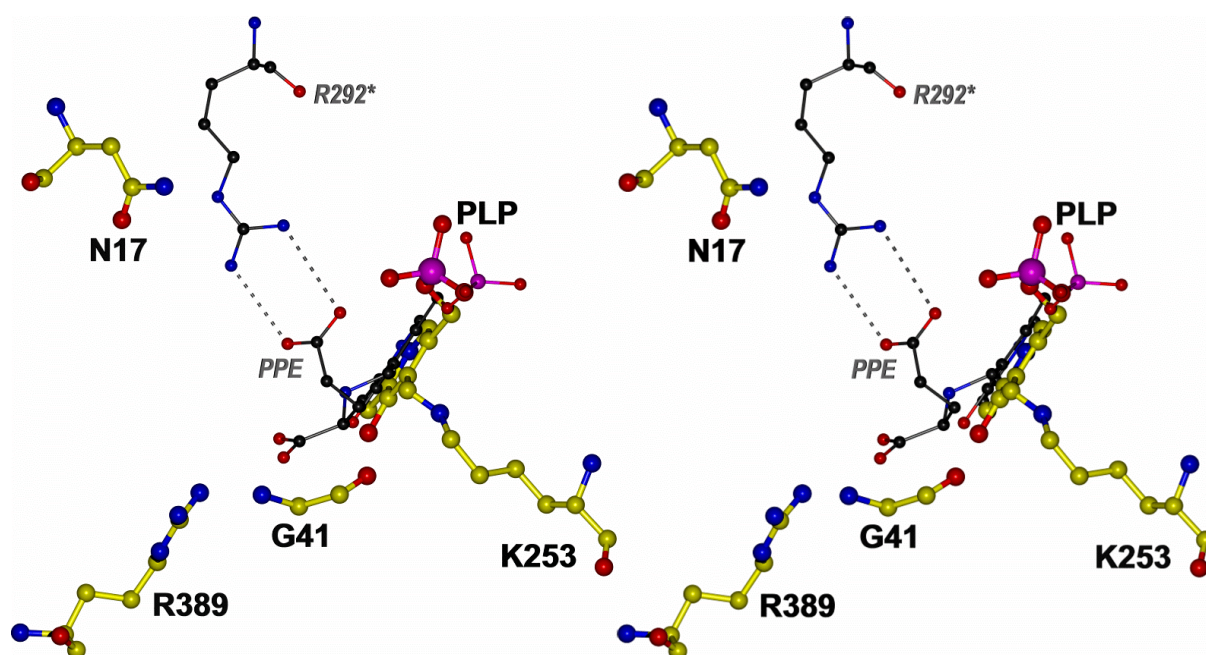


Abb. IV.33: Überlagerung des internen Glutamat-Aldimins (dünne Linien, PPE) aus der K258H-Mutante von mitochondrialer *G. gallus*-AsAT (1akc; Malashkevich *et al.*, 1994) mit dem aktiven Zentrum von *T. cruzi*-TAT

Allerdings fehlt das Arg 292 in *T. cruzi*-TAT, so daß auch andere Konformationen der Glutamatseitenkette denkbar sind. Für die meisten alternativen Standardrotamere dieser Aminosäure (Ponder & Richards, 1987; Kleywegt & Jones 1998) ergeben sich in einem externen Aldimin jedoch direkte Konflikte mit dem Proteingerüst oder dem Kofaktor. In der einzig möglichen Standardorientierung zeigt die Seitenkette aus dem Substrateintrittskanal heraus. Wenn bei *T. cruzi*-TAT wie bei *E. coli*-AsAT der Eingang zum aktiven Zentrum nach Anbindung des Substrats geschlossen wird, erweist sich auch diese Konformation als problematisch. Das Enzym müßte das Glutamat dann auf einer Route jenseits des normalen Reaktionsweges ohne oder nur mit eingeschränkter Domänenschließbewegung transaminieren.

Die hydrophoben Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin werden ebenfalls nur schlecht von *T. cruzi*-TAT umgesetzt. Diesen Substraten ist eine Verzweigung an einem sp^3 -hybridisierten C β oder C γ gemeinsam. Hierdurch kommt es in den kovalenten Reaktionsintermediaten zu ungünstigen Kontakten der unpolaren Seitenkette mit der geladenen Phosphatgruppe (Abb. IV.34). In Unterstützung dieser sterischen Hypothese zeigt Alanin unter allen quantitativ charakterisierten Substraten die größte Affinität zu *T. cruzi*-TAT, und das unverzweigte Methionin wird mit ähnlichen kinetischen Parametern wie Tyrosin umgesetzt (Nowicki, 1999). Die Fähigkeit zur Umsetzung von Methionin könnte auf eine Funktion im Polyaminsyntheseweg des Parasiten hinweisen (Berger *et al.*, 1996).

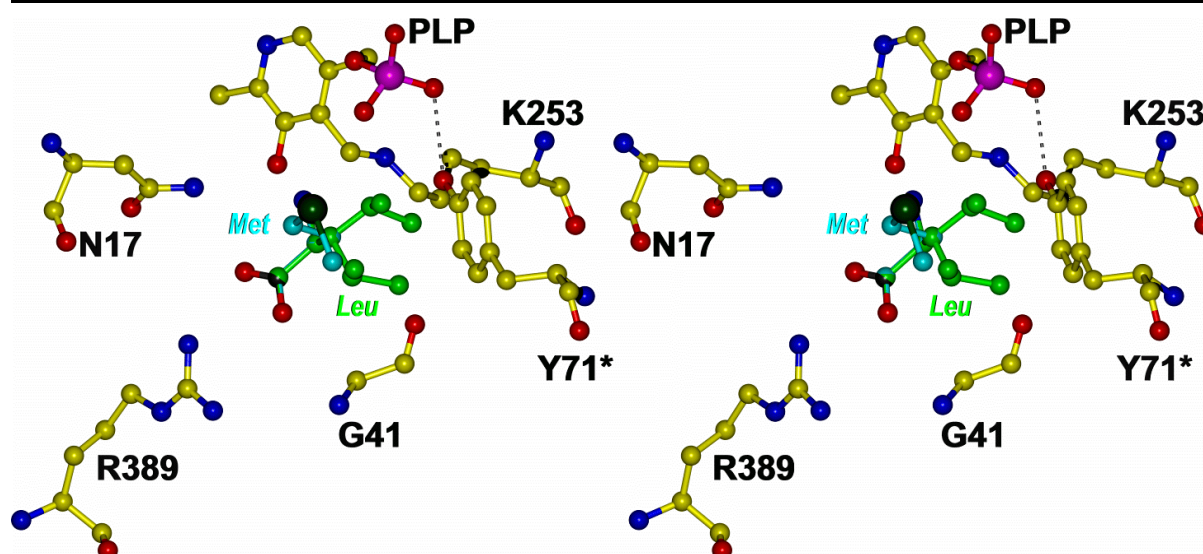


Abb. IV.34: Modell für Leucin (Leu) und Methionin (Met) im aktiven Zentrum von *T. cruzi*-TAT basierend auf der Position von α -Methylaspartat in *E. coli*-AsAT)

Die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin erweisen sich trotz fehlender Verzweigung nicht als gute Substrate der *T. cruzi*-TAT. Für beide Moleküle lassen sich jedoch sterisch konfliktfreie Standardrotamere finden, bei denen die Seitenkette entweder aus dem Substrateintrittskanal heraus oder aber in die Aromatenbindungstasche im Innern des Proteins hinein zeigt. Auf die mögliche Einschränkung der Domänenbeweglichkeit im ersten Fall wurde bereits bei Glutamat eingegangen. Bei der Orientierung ins Proteininnere würde die positive Ladung dieser Aminosäureseitenketten unsolvatisiert in eine hydrophobe oder sogar leicht positiv polarisierte Umgebung geraten, so daß ein energetisch ungünstiger Zustand resultiert (Abb. IV.35).

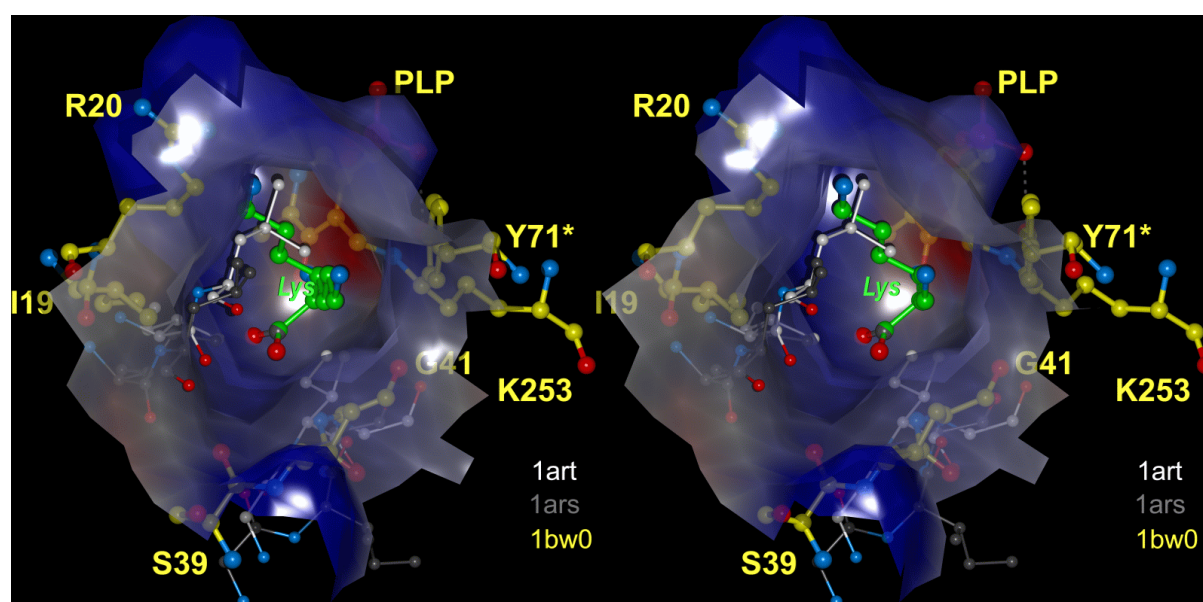


Abb. IV.35: Konflikte für mögliche Lysinkonformere. Die Aminosäuren von 1ars und 1art sollen die Veränderungen am Substrateintrittskanal verdeutlichen.

Während der Reoxidation des PMP-Enzyms werden die gleichen Zwischenstufen durchlaufen wie in der ersten Halbreaktion im Transaminierungszyklus. Prinzipiell gelten deshalb die gleichen Überlegungen wie für die Bevorzugung bzw. Diskriminierung bestimmter Aminosäureseitenketten. Fraglich ist allerdings, warum die Reoxidation mit Oxaloacetat bzw. α -Ketoglutarat überhaupt möglich ist, wenn die korrespondierenden Aminosäuren effektiv von der Transaminierung ausgeschlossen werden.

Ein Blick auf die Tabellen IV.7 bis IV.10 zeigt, daß die kinetischen Konstanten für die Umsetzung der 2-Oxoverbindungen im allgemeinen günstiger sind als die der korrespondierenden Aminosäure. Diese Beobachtung erklärt sich aus der Gleichgewichtslage der Transaminierungshalbreaktion. Die freie Enthalpie des Systems aus PLP-Enzym und Aminosäure ist geringer als die der PMP-Form, da im reduzierten Enzym eine zusätzliche Stabilisierung aus der Bildung des internen Aldimins resultiert (Velick & Vavra, 1962). Die beiden Zustände des Transaminierungssystems sind über die gleichen Reaktionsintermediate miteinander verknüpft, so daß die Aktivierungsenergie für die Regenerierung zur PLP-Aminotransferase geringer ausfällt, wenn nur Anfangs- und Endzustand der beiden Halbreaktionen betrachtet werden. Da die Bestimmung der kinetischen Parameter eines Enzyms normalerweise über die Geschwindigkeit der Produktbildung erfolgt, sind hier für die Rückreaktion günstigere Parameter zu erwarten. Bei dieser thermodynamischen Argumentation muß jedoch berücksichtigt werden, daß in der enzymatischen Transaminierung mehrere nachweisbare Zwischenprodukte entstehen. Von den dazugehörigen Reaktionsschritten darf keiner ein unüberbrückbares kinetisches Hindernis darstellen. Besonders wichtig ist, daß sich Substrat und Kofaktor zunächst soweit aneinander annähern können, daß die Reaktion initiiert wird, denn sonst wirkt das Substrat als Inhibitor.

In der Hinreaktion besteht der erste Austausch zwischen Aminosäure und PLP in der Protonierung der unterhalb des Pyridiniumringes liegenden internen Aldiminbindung durch die Aminogruppe (s. Kap. IV.2.c.2). Das Substrat muß dafür sehr dicht an den Kofaktor herankommen, denn durch die Bindung zu Lys 253 sowie die Wasserstoffbrücken mit Asn 188 und Tyr 219 ist der Pyridiniumring und im besonderen die Schiff'sche Basenbindung an eigenen Bewegungen gehindert.

In der Rückreaktion wird die Ketogruppe des Substrats durch Protonierung mittels des nunmehr freien Lysinrestes aktiviert. Der erste direkte Kontakt mit PMP erfolgt bei der Bildung des tetraedrischen Intermediats aus der Aminogruppe des Kofaktors und der 2-Oxofunktion des α -Ketosubstrats. Da die Verankerung des Pyridiniumringes hier gelöst ist, entspannt sich der Kofaktor über die internen Torsionswinkel durch Drehung des aromatischen Ringes in Richtung der Substratbindungsstelle. Außerdem residiert die Aminogruppe nicht wie im internen Aldimin unterhalb des Ringes, sondern wandert in der PMP-Form in eine beinahe koplanare Position zum π -System. Der zu überwindende Abstand zwischen den reagierenden Atomen von Kofaktor

und Substrat wird dadurch stark verkleinert, während die Distanz der Substratseitenkette zur Phosphatgruppe erhalten bleibt (4.6 gegenüber 3.7 Å für die reagierenden Atome im Modell von Abb. IV.36). Zusätzlich ist zu bedenken, daß das C α im Ketosubstrat sp²-hybridisiert ist, während bei der Aminosäure eine L-Konfiguration vorliegt. Wird ein Enzym-Substrat-Komplex für Aminosäure und α -Ketoverbindung auf der Grundlage der Docking-Simulationen an *T. cruzi*-TAT ins aktive Zentrum von *E. coli*-AsAT modelliert, zeigt sich, daß die Seitenkette der Aminosäure durch den Konfigurationsunterschied dem Kofaktor wesentlich näher kommt und sich somit die Gefahr einer ungünstigen Wechselwirkung erhöht (Abb. IV.36).

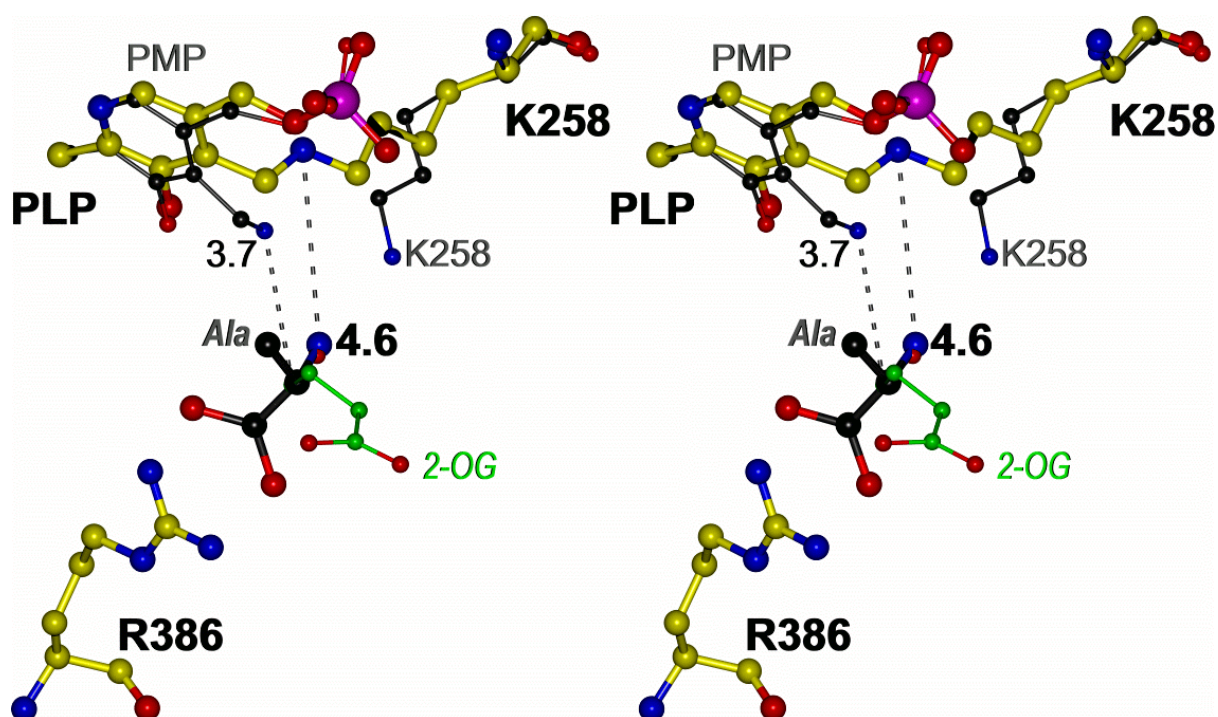


Abb. IV.36: Hypothetischer α -Ketoglutarat-Komplex von *E. coli*-AsAT (Iars; Okamoto *et al.*, 1994), modelliert auf der Grundlage der Docking-Rechnungen für Tyrosin an *T. cruzi*-TAT. Überlagert ist der reduzierte Kofaktor gezeigt (dünne Linien, 1amq; Miyahara *et al.*, 1994). Die Konformation von α -Ketoglutarat wurde so gewählt, daß sich keine Konflikte mit der Struktur von *T. cruzi*-TAT ergeben.

In den folgenden Schritten könnten sich die kovalenten Intermediate in Richtung PLP-Aminotransferase durch nichtoptimale interne Orientierung mit der Phosphatgruppe arrangieren. Die Gesamtreaktion wird dann durch die freie Enthalpie vorangetrieben.

IV.2.e Ein erster Blick auf die menschliche Tyrosin-Aminotransferase

T. cruzi-TAT und die Tyrosin-Aminotransferase des Menschen besitzen eine Sequenzidentität von ca. 41 % und eine Sequenzähnlichkeit von ca. 72 % (bei Verwendung einer Substitutionshäufigkeitsmatrix; Risler *et al.*, 1988). Wesentlich nähere Verwandtschaft zur menschlichen TAT zeigt die Tyrosin-Aminotransferase aus Rattenleber. Die beiden Enzyme sind zu 92 % identisch und zu 96 % ähnlich. Aufgrund der engen Beziehung kann davon ausgegangen werden, daß die Charakteristika der enzymatisch besser untersuchten Ratten-TAT (Iwasaki *et al.*, 1973; Dietrich *et al.*, 1991; Stellwagen, 1992) näherungsweise auf das humane Protein übertragen werden können.

Die Tyrosin-Aminotransferasen von Mensch und Ratte besitzen gegenüber dem Enzym aus *T. cruzi* N-terminal ca. 40 und C-terminal ca. 10 zusätzliche Aminosäuren. Wie molekularbiologisch-enzymologische Untersuchungen zeigen, können die verlängerten Termini abgetrennt werden, ohne daß die Aktivität des Proteins beeinträchtigt wird. Bei den Verlängerungen handelt es sich um Signalpeptide, die den Abbau des Proteins über die Ubiquitinylierung von Lysinresten im N-Terminus bzw. eine PEST-Sequenz im C-Terminus steuern (Stellwagen, 1992; Gross-Mesilaty *et al.*, 1997). Im verbleibenden gemeinsamen Sequenzbereich besitzt *T. cruzi*-TAT lediglich zwei größere Einschübe von sechs (Position 95) bzw. vier Aminosäuren (Position 226) und drei einfache Insertionen/Deletionen gegenüber den Säuger-Enzymen. Alle diese Veränderungen lassen sich sicher lokalisieren (Abb. IV.17).

Aus dem Grad der Sequenzverwandtschaft der drei Proteine läßt sich schließen, daß sie eine sehr ähnliche Raumstruktur besitzen (Chothia & Lesk, 1986). Da außerdem die Positionen von Insertionen und Deletionen zweifelsfrei bestimmt werden können, ist es möglich, ein vorläufiges Strukturmodell von humaner TAT aus der Struktur des Enzyms von *Trypanosoma cruzi* zu konstruieren und dieses Modell zur Ableitung qualitativer Erklärungen für einige Eigenschaften des menschlichen Proteins heranzuziehen

IV.2.e.1 Vererbte Mutationen bei Richner-Hanhart-Syndrom

Die autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit "Richner-Hanhart-Syndrom", auch bekannt als Tyrosinämie Typ II, führt durch Mutationen im TAT-Gen zu defizienter Tyrosin-Aminotransferaseaktivität (Fellman *et al.*, 1967). Die Störung äußert sich in starker Verhornung und Rissigkeit der Haut von Handinnenfläche und Fußsohle und Verletzungen der Cornea. Häufig geht die Krankheit mit neurologischen Symptomen einher (Richner, 1938; Hanhart, 1947). Zahlreiche krankheitsassoziierte Mutationen wurden mit molekularbiologischen Methoden identifiziert. Sehr häufig handelt es sich hierbei um Veränderungen, die zu einem unvollständigen Protein führen (Natt *et al.*, 1992; Hühn *et al.*, 1998). In einigen Fällen beruht die Abwesenheit von Enzymaktivität jedoch auf einfachen Aminosäuresubstitutionen, deren Effekt

aus dem Strukturmodell von humaner TAT erklärt werden kann.

Der Austausch von Arg 81 gegen Tryptophan (**R119W** in humaner TAT; Hühn *et al.*, 1998) plaziert eine voluminöse Aminosäureseitenkette am N-Terminus von Helix $\alpha 3$. Es ist nicht möglich, diese Position mit einem Standardrotamer von Tryptophan zu besetzen, ohne daß es zu sterischen Konflikten mit anderen Bereichen der Proteinstruktur kommt. Diese Mutation führt demnach zu einem mißgefalteten Enzym ohne Aktivität.

Durch die Positionierung eines Arginins an Sequenznummer 170 (**L201R**; Hühn *et al.*, 1998) wird eine positiv geladene Gruppe mitten in einen aus mindestens zehn Aminosäuren gebildeten hydrophoben Cluster gebracht (Abb. IV.37). Es ist wiederum nicht möglich, die Seitenkette ohne abstoßende Wechselwirkungen zu arrangieren, so daß auch diese Veränderung zu einer ungefalteten Aminotransferase führen wird.

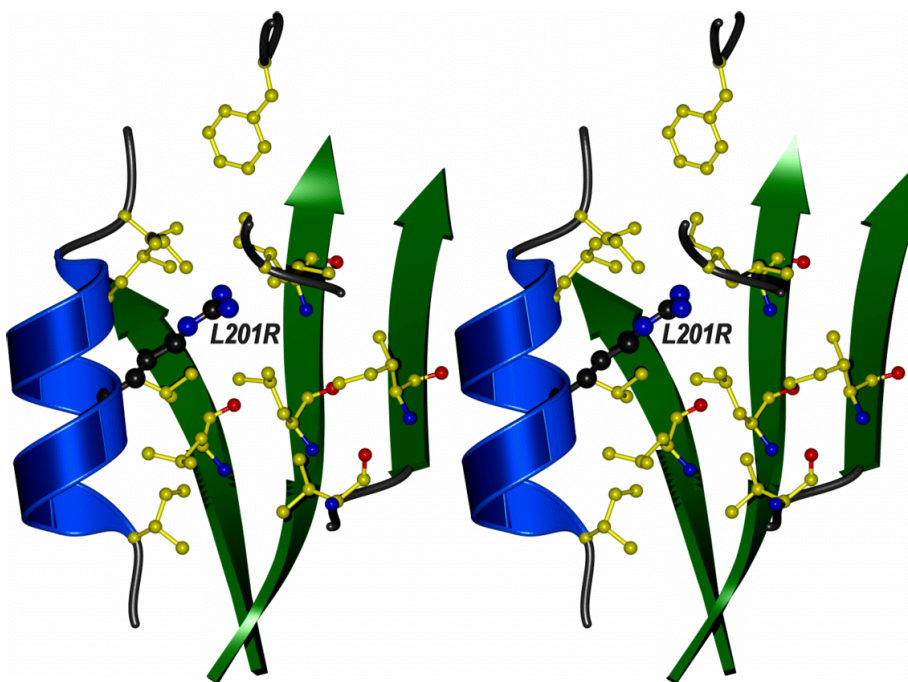


Abb. IV.37: L201R-Mutante bei Richner-Hanhart-Syndrom

Bei zwei weiteren zu Richner-Hanhart-Syndrom führenden Mutationen ist das nahe am C-Terminus des Proteins liegende Arg 405 betroffen (**R433Q** und **R433W** in humaner TAT; Hühn *et al.*, 1998). Bei diesen Enzymen geht die Aktivität nicht völlig verloren, sondern ist lediglich reduziert. Die Guanidinogruppe dieses konservierten Arginins ist in ein Wasserstoffbrückengeflecht mit der Seitenkette des ebenfalls konservierten Glu (O ϵ 2) und den Carbonylsauerstoffatomen von Aminosäure 372 sowie dem N-terminalen Rest 34 involviert (Abb. IV.38).

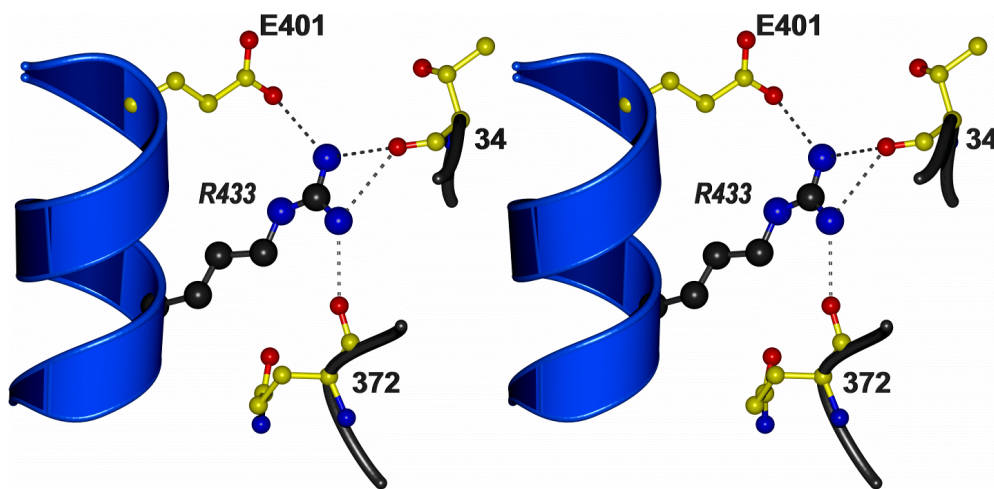


Abb. IV.38: Wasserstoffbrücken der Guanodinogruppe von R433 im Modell von humaner TAT

Die Unterbrechung dieses Netzwerkes kann die Funktionalität des Proteins beeinflussen, weil hierdurch eine Wechselwirkung zwischen dem N- und C-terminalen Sequenzabschnitt der substratbindenden Domäne entfällt. Die Natur der Störung ist allerdings nicht festzustellen: zum einen könnte die Stabilität der Domäne herabgesetzt sein, so daß z.B. die prolinreiche N-terminale Schleife (Pro 28 bis Pro 34 in *T. cruzi*-TAT) nicht mehr ausreichend fixiert ist und so das Substrat beim Eintritt ins aktive Zentrum behindert. Dabei könnte es gleichzeitig zur Zerstörung des kleinen parallelen Faltblattes $\beta\alpha/\beta\beta$ kommen, denn das Arginin verlängert den Kontaktbereich zwischen den sehr kurzen Strängen dieses Sekundärstrukturelements (Abb. IV.38). Eine andere mögliche Konsequenz liegt in der Beeinflussung der dynamischen Eigenschaften des Proteins: für die mit der Substratbindung einhergehende Schließbewegung der kleinen Domäne müssen N- und C-Terminus miteinander koordiniert werden. Auf der einen Seite bringt die leichte Verschiebung des α -carboxylatbindenden Arg 389 das Substrat dichter an den Kofaktor heran, auf der anderen Seite wird das aktive Zentrum durch starke strukturelle Veränderungen in der N-terminalen Sequenz der Domäne abgeschlossen und so das Substrat am Verlassen der Bindungsstelle gehindert. Ein Eingriff in die Feinabstimmung dieses Mechanismus kann leicht Einfluß auf die Reaktivität des Proteins nehmen, zumal einige Schritte des enzymatischen Transaminierungszykluses zumindest bei *E. coli*-AsAT diffusionskontrolliert ablaufen, d.h. die Aminotransferase die Reaktion optimal katalysiert (Goldberg *et al.*, 1996). Eine kompliziertere Situation ergibt sich in einer Doppelmutante von humaner TAT, bei der gleichzeitig eine Splice-Variation in Intron 8 und ein Aminosäureaustausch **G362V** (Position 334 in *T. cruzi*-TAT; Natt *et al.*, 1992) festgestellt wurden. Das Glycin ist in der Dreiergruppe der

Tyrosin-Aminotransferasen aus Mensch, Ratte und *T. cruzi*-TAT konserviert. Es liegt in der C-terminalen Schleife von Helix $\alpha 13$ und nimmt in der Struktur eine Hauptkettengeometrie an, die in anderen Aminosäuren nur schlecht realisiert werden kann ($\varphi = 87^\circ$; $\psi = -4^\circ$), so daß sich der Aktivitätsverlust in diesem Enzym auch aus einem fehlerhaften Faltungsverhalten erklären lassen könnte. Da das Glycin jedoch sehr weit vom aktiven Zentrum entfernt liegt, kann ein Einfluß der nicht näher charakterisierten Splice-Mutation nicht ausgeschlossen werden.

IV.2.e.2 Substratspezifität von humaner TAT

Im Gegensatz zur *T. cruzi*-TAT bevorzugen die Säuger-Tyrosin-Aminotransferasen α -Ketoglutarat vor Pyruvat für die Reoxidation des PMP-Enzyms (Tab. IV.8; Iwasaki *et al.*, 1973). Außerdem scheinen sie in ihrer Präferenz von Tyrosin als Aminosäuresubstrat stärker ausgeprägt zu sein. Alanin wird von ihnen nicht umgesetzt (Dietrich *et al.*, 1991).

Das Modell von humaner TAT zeigt, daß im Vergleich zu *T. cruzi*-TAT fast alle Aminosäuren des aktiven Zentrums konserviert sind. Die einzige Ausnahme bildet die Substitution eines Glycins durch ein Cystein an Position 113 des Parasitenenzym. Diese Stelle liegt am Beginn von Helix $\alpha 5$, die über ihren N-terminalen Dipol zur Fixierung der Phosphatgruppe vom Kofaktor beiträgt. Durch die Substitution kommt es im Modell zu sterischen Konflikten mit dem aromatischen Ring des Pyridoxal-5'-Phosphats, wenn der Kofaktor die gleiche Konformation wie in *T. cruzi*-TAT einnimmt (Abb. IV.39).

Das Sequenzalignment weist an dieser Stelle eine Unsicherheit auf, da kurz vor dieser Position eine der o.g. größeren Insertionen und eine weitere einfache Insertion lokalisiert sind. Die Verschiebung der Sequenzen um eine Position gegeneinander zur Erhaltung von Gly 113 würde jedoch einige konservierte Aminosäuren nicht mehr aufeinanderfallen lassen und außerdem eine falsche Polaritätsverteilung der Seitenketten von Helix $\alpha 5$ erzeugen. Zudem würde die Stelle 112 nicht mehr von einem Glycin besetzt. In *T. cruzi*-TAT nimmt dieser Rest 112 eine Konformation ein, die anderen Aminosäuren in der Regel nicht offensteht ($\varphi = 79.1^\circ$; $\psi = 175.4^\circ$). Es ist daher wahrscheinlich, daß das Sequenzalignment in Abb. IV.17 korrekt ist.

Die Konsequenzen der Substitution lassen sich mit dem einfachen Modell des menschlichen Enzyms nicht vorhersagen. Es besteht die Möglichkeit, daß durch die vorhergehenden Deletionen Platz für die zusätzliche Seitenkette geschaffen wird, z.B. indem die Helix $\alpha 5$ gegenüber der Position in *T. cruzi*-TAT verschoben ist. Das Cystein könnte dabei in eine Disulfidbrücke mit einem weiteren Cystein an Position 248 aus dem Faltblattstrang $\beta 6$ involviert sein. Aminosäure 248 liegt in dem Strukturmodell aber auch nahe an Cys 120 (*T. cruzi*-TAT-Nummerierung), so daß es auch eine kovalente Bindung mit diesem Rest eingehen könnte. Biochemische Untersuchungen legen die Existenz von drei Disulfidbrücken in Ratten-TAT nahe, allerdings ist ihre sequentielle Position nicht bekannt (Dietrich *et al.*, 1991).

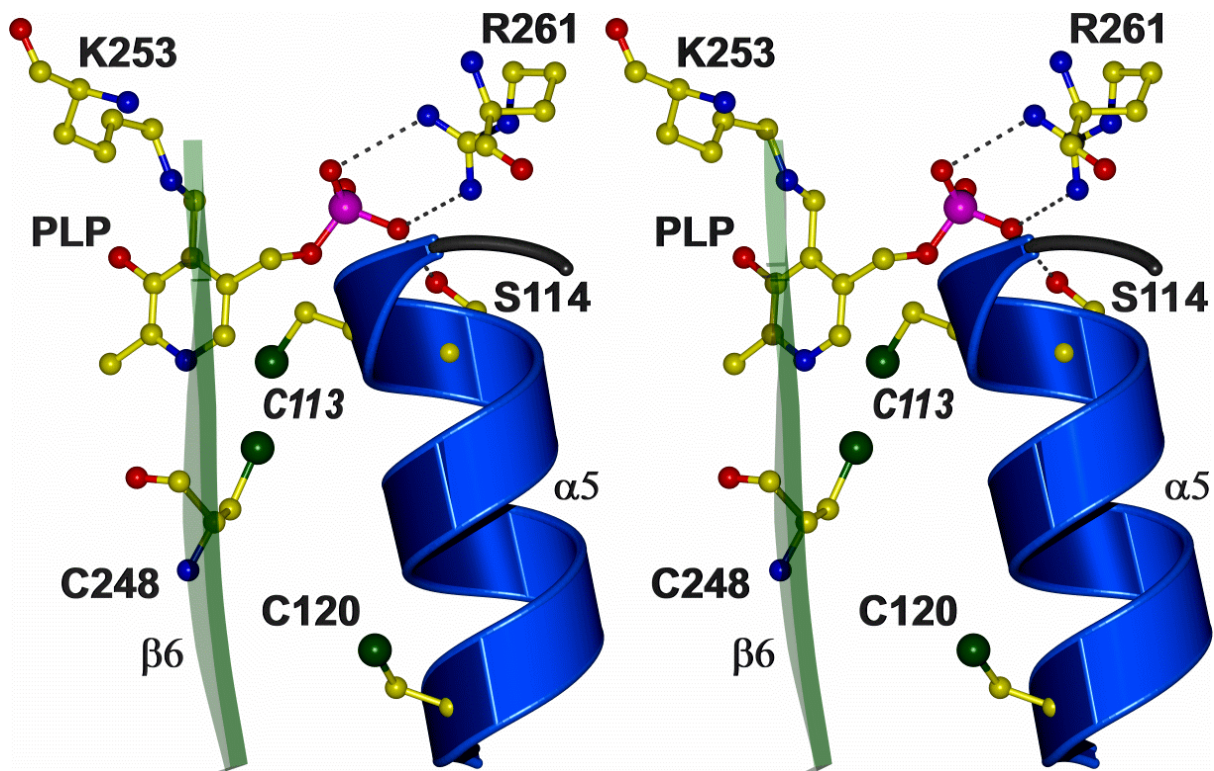


Abb. IV.39: Position von C113 (*T. cruzi*-TAT-Nummerierung) im Modell von humaner TAT. Die Position von C120 und C248 läßt auf mögliche Disulfidbrücken schließen.

Da das Cystein an Position 113 die einzige Thiofunktion in der Nähe des aktiven Zentrums von humaner TAT besitzt, ist hier eventuell ein Zusammenhang zu der reversiblen Deaktivierung des Enzyms durch Persulfide und elementaren Schwefel, die beide bei der Desulfurierung von Cystin durch γ -Cystathionase entstehen (Hargrove & Wichman, 1987; Hargrove, 1988), herzustellen. Die Natur der zur Deaktivierung führenden Derivatisierung ist jedoch nicht klar. In der Literatur wird die Umwandlung von Disulfidbrücken zu Trisulfiden vorgeschlagen (Yamanishi & Tuboi, 1981; Hargrove, 1987), aber auch die Reaktion mit freien Thiolgruppen des inhibierten Enzyms unter Bildung von Thiocystein wie im Fall von Rhodanese (Westley, 1973) ist denkbar. Folglich kann auch aus diesen Untersuchungen nicht festgestellt werden, ob Cys 113 in den Tyrosin-Aminotransferasen von Mensch oder Ratte frei oder in Form einer Disulfidbrücke vorliegt. Die reversible Deaktivierung von zytosolischen Enzymen durch Thiolverbindungen könnte einen physiologischen Regulationsweg bestimmter Stoffwechselsysteme darstellen (Gilbert, 1982; Ondarza, 1989; Gilbert, 1995) und somit ein weiteres Indiz für die abweichende Funktion der Tyrosin-Aminotransferase in *Trypanosoma cruzi* liefern, denn hier ist mit dem Austausch gegen ein Glycin diese Regulierungsmöglichkeit nicht gegeben.

Die Anwesenheit der voluminöseren Thiolgruppe in den Säuger-Tyrosin-Aminotransferasen muß Konsequenzen für den Kofaktorbindungsmodus haben. Der genaue Effekt läßt sich mit dem Modell von humaner TAT jedoch nicht bestimmen. Denkbar ist beispielsweise, daß eine Verschiebung von Helix $\alpha 5$ mit einer Veränderung der Torsionswinkel in PLP einhergeht, so daß die Phosphatbindung derjenigen in *E. coli*-AsAT ähnlich wird, weil die PO_4 -Gruppe die Wechselwirkung mit den Resten der Helix und mit ihrem Dipolmoment erhalten muß. Die für *T. cruzi*-TAT postulierten Diskriminierungsmechanismen für Dicarboxylatverbindungen würden dann entfallen. Gleichwohl scheint den Tyrosin-Aminotransferasen aus Mensch bzw. Ratte das zweite β -carboxylatbindende Arginin zu fehlen (Arg 292 in *E. coli*-AsAT, s. Abb. IV.17), so daß eine alternative Möglichkeit zur Neutralisierung der zusätzlichen negativen Ladung dieser Moleküle existieren muß, denn sonst würde es in einer geschlossenen Struktur mit diesen Substraten zu einem Überschuß an negativer Ladung im Innern der Bindungsstelle kommen. Aus der Struktur von *T. cruzi*-TAT kann Arg 20 für diese Aufgabe vorgeschlagen werden. Dieser Rest ist in der Dreiergruppe der Klasse-I γ -Tyrosin-Aminotransferasen konserviert und läßt sich durch Auswahl eines geeigneten Standardrotamers leicht in eine Orientierung bringen, bei der die Guanidinogruppe die Position von Arg 292 in *E. coli*-AsAT bzw. *P. denitrificans*-ArAT einnimmt. In der Struktur von *T. cruzi*-TAT erweist sich die Seitenkette des Arg 20 als wenig fixiert, so daß sie in Monomer A eine dem aktiven Zentrum abgewandte Konformation einnimmt, während sie bei Monomer B in Richtung der Substratbindungsstelle zeigt (Abb. IV.40). Diese Aminosäure sollte sich also durch die Anbindung entsprechender Moleküle leicht beeinflussen lassen.

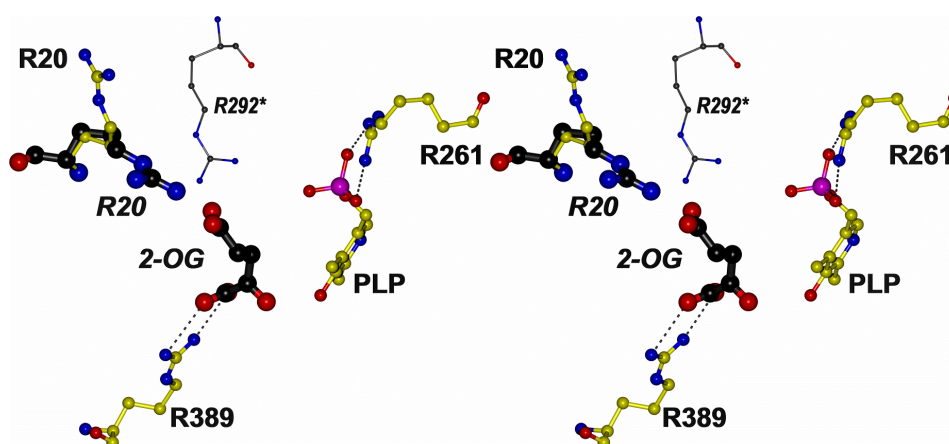


Abb. IV.40: Modell eines α -Ketoglutaratkomplexes (2-OG). Möglicherweise kann R20 durch die Verwendung eines alternativen Standardrotamers die Funktion von R292* in *E. coli*-AsAT übernehmen (aus Struktur 1art, Okamoto *et al.*, 1994). Der Kofaktor ist in der *T. cruzi*-TAT-Konformation wiedergegeben.

Wenn diese Stabilisierung in den Tyrosin-Aminotransferasen aus Mensch und Ratte existiert, wären in *T. cruzi*-TAT die Anlagen zur Umsetzung von Dicarboxylatverbindungen ebenfalls enthalten. Gleichzeitig wird diese Fähigkeit des Enzyms jedoch durch die veränderte Phosphatbindungsstelle unterdrückt.

IV.2.f Einblicke in weitere Aminotransferasen mit unbekannter Struktur

T. cruzi-TAT gehört zur Aminotransferasen-Klasse I. Für diese Gruppe von Enzymen wurde in der Literatur auf der Basis von Sequenzalignments eine Aufspaltung in sieben Unterfamilien vorgeschlagen, wonach *T. cruzi*-TAT in die Unterfamilie I γ und *E. coli*-AsAT sowie *P. denitrificans*-ArAT in I α eingeordnet werden (Jensen & Gu, 1996). Während die I α -Enzyme strukturell sehr gut charakterisiert sind (Frühjahr 1999: 67 PDB-Einträge), wurden Strukturen aus den anderen Subfamilien bisher nicht veröffentlicht. Die hier vorgestellte Struktur eröffnet damit den Einblick in eine strukturell unbeschriebene Unterfamilie. Da *E. coli*-AsAT als Vertreter der Klasse I α und *T. cruzi*-TAT als Vertreter von Klasse I γ sequentiell sehr stark divergieren (Sequenzidentität 13 %, s. Kap. IV.2.a), zu den anderen Unterfamilien jedoch teilweise engere Verwandtschaften bestehen, ist es zudem möglich, bereits publizierte Sequenzalignments auf der Grundlage des Strukturvergleichs in Abb. IV.17 zu verbessern und andere Enzyme auf charakteristische Strukturelemente aus *T. cruzi*-TAT abzusuchen. Es ergibt sich folgendes Bild:

- a.) An der Position, an der *T. cruzi*-TAT ein drittes cis-Prolin besitzt, findet sich in den uncharakterisierten Subfamilien ebenfalls ein Prolin (Abb. IV.41). Gegenüber den Aminotransferasen aus Unterfamilie I α entsteht in diesem Bereich eine Deletion von einer Aminosäure. Durch die cis-Konformation wird den unmittelbar benachbarten Resten die Teilnahme an einem weitverzweigten Wasserstoffbrückennetzwerk ermöglicht, das die Positionierung der hochkonservierten kofaktorbindenden Aminosäuren Asn 188 und Tyr 219 steuert. Außerdem liegt die Position in der Berührungszone von kofaktor- und substratbindender Domäne (nicht gezeigt). Die Feinsteuerung dieses Kontaktes dürfte für die katalytischen Eigenschaften dieser Proteine von Bedeutung sein.

	190
T.cruzi-TAT	LLIVTNP.SNP ^{CS} GS
E.coli-AsAT	VVLFHGCCHNP ^{TI} GI
ALPHA	MVLLHGCCHNP ^{TGA}
BETA	VVFIANP.NNP ^{TGT}
GAMMA	CLIVNNP.SNP ^{CS} GS
DELTA	VLIVINP.GNP ^{TGA}
PHI	MICVSRP.TNP ^{TGN}
LAMBDA	.VIVVNP.NNP ^{TGR}
OMEGA	IMLLCSP.QNP ^{TCK}

▲

Abb. IV.41: Subfamilien der Aminotransferasen-Klasse-I. Sequenzalignment um Stelle 190 (*T. cruzi*-TAT). Die Position des dritten cis-Prolins ist gekennzeichnet (▲). Die obere Gruppe zeigt den Ausschnitt des strukturbasierten Sequenzalignments (Abb. IV.17). Als Beispielproteine für die untere Gruppe wurden gewählt: α : ArAT (PDTYRB, EC 2.6.1.57), β : Histidinol-Phosphat-AT (HIS8_ZYMMO, EC 2.6.1.9), γ : Tyrosin-Aminotransferase (ATTY_HUMAN, EC 2.6.1.5), δ : Alanin-AT (ALAT_YEAST, EC 2.6.1.2), ϕ : Valin-Pyruvat-AT (AVTA_ECOLI, EC 2.6.1.66), λ : COBC-Protein (COBC_PSEDE), Ω : MALY-Protein (MALY_ECOLI)

- b.) Die Dreiergruppe aus *T. cruzi*, humaner und Ratten-TAT bildet eine Ausnahme bzgl. der Gestaltung der Phosphatbindungsstelle, da alle anderen Enzyme in den drei Aminosäuren vor dem kofaktorbindenden Lysinrest zumindest ein Serin als Wasserstoffbrückendonator anbieten können. Die hydrophobe Tasche, die in *T. cruzi*-TAT beschrieben wird (Kap. IV.2.b), nimmt damit eine Sonderstellung ein. Bei der Besetzung im N-Terminus von Helix $\alpha 5$ bestehen zwischen den Subfamilien Unterschiede, die ebenfalls die Phosphatbindung beeinflussen werden (Abb.IV.42).

	110	220	250	260
T.cruzi-TAT	NVVLCSG ^G SHG	LFSDEIYAG	ILGGTAK ^N NLVVPG.WRLG ^W L	
E.coli-AsAT	RTAQTPG ^G TGA	PLFD ^F FAYQG	VASSYSK ^N NFGLYN.ERVG ^G AC	
ALPHA	ATLATVG ^G TGA	PLID ^D LAYQG	IAASCSK ^N NFGIYR.ERTG ^G CL	
BETA	RIIHGTG ^S SDEI	LVIDQAYAE	VTRTFSKIYGLAA.ERIG ^G WA	
GAMMA	.VILTSG ^S CSQA	ILADEIYGD	SCGGLAK ^R RWLVPG.WRLG ^G WI	
DELTA	DIYLTTG ^A ASSA	IISDEVYQE	SLHSISK ^G FMDECGQRG ^G YM	
PHI	NIALTN ^G SQSA	LVIDNAYGV	LCMSLSK ^L GLPG..SRCG ^I II	
LAMBDA	VLPLPV ^P GTQS	LLVDEAFGD	VFRSFGK ^F FFLAG.LRLG ^F V	
OMEGA	SQTVVYG ^P SVI	VISDEIHMD	LTSG.SK ^S SFNIP..ALTG ^G AY	

▲ ▲ ▲ ▲

Abb. IV.42: Phosphatbindungsstelle in AT-Klasse I. Sequenzen s. Abb. IV.41

- c.) In der substratbindenden Domäne ist das α -carboxyatbindende Arginin 389 (*T. cruzi*-TAT-Nummerierung) in fast allen Unterfamilien erhalten. Auch das Sequenzmotiv GAMY (Position 342 bis 345 in *T. cruzi*-TAT) mit einem Alanin in sehr ungewöhnlicher Konformation ($\phi = 61.7^\circ$; $\psi = -156.6^\circ$) findet sich häufig wieder. Dieser Bereich liegt in der Nähe des aktiven Zentrums, und Tyr 345 wurde in Kapitel IV.2.b als Mitglied der zweiten Koordinationssphäre vom Kofaktor beschrieben. Auch das zusätzliche cis-Prolin steht in Kontakt mit dieser Schleife, so daß eine gegenseitige Stabilisierung bestehen könnte.

Wenig konserviert scheint hingegen das Sequenzmotiv SVG (Reste 39 bis 41) bzw. GIG (36 bis 38 in *E. coli*-AsAT) im N-Terminus zu sein (Abb. IV.43). Diesem Bereich wird eine Scharnierfunktion bei der Domänenschließbewegung in den Aminotransferasen aus Unterfamilie Ia zugesprochen (Rhee *et al.*, 1997). Möglicherweise variiert bei diesen Enzymen der Schließmechanismus, oder es kommt wie bei Aminotransferasen aus anderen Klassen nicht zu einer Konformationsänderung nach Substratbindung (s. Kap. IV.2.a.4).

	40	340	390
T.cruzi-TAT	KLSV ^G DP	PRGAMY ^L MSR	PGFT ^R LTT
E.coli-AsAT	NLGIGVY	KQNGMFSFSG	...G ^R VNV
ALPHA	DLGVGVY	EHRGMFSRLG	...S ^R INI
BETA	LDGRPAV	PSSANFTLLL	PHAL ^R ITI
GAMMA	SLSIGDP	PSGAMYLMVG	PNFI ^R VVI
DELTA	VLAILEY	PQGAMYLFP	...Q ^R PGT
PHI	MLGGGNP	PEGAI ^F LWLW	HQCM ^R MNY
LAMBDA	PEDWLDL	GGTGLFVLVE	...T ^R LRV
OMEGA	DLLPFTI	PQSTYLAWLD	RGFV ^R LNA
	▲ ▲	▲▲▲▲	▲

Abb. IV.43: Abschnitte aus den substratbindenden Domänen in AT-Klasse-I. Sequenzen s. Abb. IV.41

Auch der Asparaginrest Asn 17, der nach den Docking-Simulationen für die Bindung der Phenolgruppe eines Tyrosinsubstrats vorgeschlagen wurde (s. Kap. IV.2.d), ist in den anderen Subfamilien und innerhalb der Gruppe I γ nicht erhalten (Sequenzen nicht gezeigt).

V. Ausblick

***T. cruzi*-TAT: ein neuer Angriffspunkt in der Bekämpfung der Chagas-Krankheit?**

Damit ein ausgewähltes Enzym als pharmakologisches Zielmolekül dienen kann, muß es im Parasiten, der bekämpft werden soll, eine überlebenswichtige Funktion erfüllen. Ein wirksames Medikament wird die Aktivität des Enzyms bis auf ein für den Krankheitserreger kritisches Maß reduzieren, wobei es aber keine unverhältnismäßigen Nebenwirkungen hervorrufen darf. Für den Fall, daß im Wirt ein zum Zielmolekül ähnliches Protein existiert, sind die Chancen, einen wirksamen Angriffspunkt auszuwählen, besser, je unterschiedlicher die Funktion und die genaue Charakteristik des Enzyms in den beiden Organismen sind.

Beim Menschen ist TAT ein Glucocorticoid-induzierbares Enzym in der Leber, das den ersten Schritt im Tyrosin-Abbau katalysiert. Es wird normalerweise auf sehr niedriger Konzentration gehalten und besitzt nur eine kurze Halbwertszeit, da über die terminalen Signalsequenzen ein schneller Abbau induziert wird (Hargrove & Granner in Christen & Metzler, 1995; Dietrich, 1992). Eine vererbte TAT-Defizienz löst beim Menschen eine schwere Krankheit, das Richner-Hanhart-Syndrom, aus. Zu *T. cruzi*-TAT besteht mit einer Sequenzidentität von ca. 41 % eine deutliche Verwandtschaftsbeziehung.

Über die Aufgabe der Tyrosin-Aminotransferase in Trypanosomatiden herrschen unterschiedliche Ansichten. Die hohe Konzentration des Enzyms in Epimastigoten und die Tatsache, daß große Mengen an Abbauprodukten von aromatischen Aminosäuren in den Kultivierungsmedien (Montemartini *et al.*, 1994a) bzw. in den Sera infizierter Individuen akkumulieren (Stibbs & Seed, 1975b; El Sawalhy *et al.*, 1998), weist auf eine besondere Bedeutung der Aminotransferase für den Parasiten hin. Sie könnte in der Reoxidation von NADH und damit im Energiestoffwechsel angesiedelt sein (Montemartini *et al.*, 1994a). Andere Autoren vermuten eine immunologische Funktion (Seed *et al.*, 1983), da TAT auch die Oxidation von Tryptophan katalysiert und das Produkt im Anschluß durch eine Dehydrogenase in Tryptophol (3-Indolethanol) überführt werden kann. Tryptophanderivate können die Immunantwort des Wirtes modulieren (Taylor und Feng, 1991), und eine Dehydrogenase für aromatische α -Hydroxyverbindungen ist in *T. cruzi* charakterisiert (Montemartini *et al.*, 1994b). Neuere Untersuchungen stellen beide Hypothesen in Frage und siedeln TAT anstelle dessen in der Rückgewinnung von Methionin aus α -Ketomethiobutyrate an (Berger *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1998). Diese α -Ketoverbindung entsteht während der Synthese von Spermidin, das in der Folge mit Glutathion zu Trypanothion kondensiert. Trypanothion wurde bisher fast ausschließlich in Trypanosomatiden nachgewiesen (Fairlamb *et al.*, 1985; s. aber: Ondarza *et al.*, 1997; Montrichard *et al.*, 1999) und dient diesen

Organismen als reduzierendes Agens für die Entgiftung von Peroxiden (Nogoceke *et al.*, 1997). Beim Menschen übernimmt Glutathion die Funktion von Trypanothion. Aufgrund dieses Unterschiedes können alle Proteine, die in die Generierung dieser Verbindung involviert sind, als potentielles pharmakologisches Zielmolekül betrachtet werden (Flohé, 1998).

Jede der Hypothesen weist der trypanosomalen TAT eine Stellung zu, die sich deutlich von der Detoxifizierungsfunktion des menschlichen Enzyms unterscheidet. Da es sich in allen drei Fällen um überlebenswichtige Aufgaben für den Parasiten handelt, könnte *T. cruzi*-TAT tatsächlich einen neuen Angriffspunkt in der Bekämpfung der Amerikanischen Trypanomiasis bieten. Ein schlüssiger experimenteller Nachweis für die Lebensnotwendigkeit des Proteins sowie Informationen über die erforderliche Enzymkonzentration stehen jedoch noch aus.

Bei der Entwicklung eines gegen *T. cruzi*-TAT gerichteten Medikamentes sind einige Punkte zu berücksichtigen:

Neben den großen Enzymmengen, die ein solches Präparat für die Abtötung des Parasiten wahrscheinlich inhibieren müßte, könnte ein Problem in der Wechselwirkung mit anderen Aminotransferasen im Wirtsorganismus bestehen. Diese Enzyme sind praktisch an allen physiologischen Umsetzungen von Aminogruppen beteiligt und entsprechend groß ist ihre Anzahl. Einige Beispiele zeigen jedoch, daß es prinzipiell möglich ist, Inhibitoren von Aminotransferasen als Medikamente zu verwenden. So wird als Mittel gegen epileptische Anfälle Vigabatrin® eingesetzt, ein Inhibitor der γ -Aminobuttersäure-Aminotransferase, der den Abbau des Neurotransmitters GABA (γ -Aminobuttersäure) verhindert (Lippert *et al.*, 1977; Nanavati & Silverman, 1991). Für die Bekämpfung der Afrikanischen Trypanomiasis steht seit einigen Jahren Eflornithin (Ordinyl®) zur Verfügung. Dieses Präparat greift in den Peroxiddetoxifizierungsmechanismus des Parasiten ein, indem es seine Ornithindecaboxylase, ein ebenfalls PLP-abhängiges Enzym, das mit Putrescin den zweiten Aminbaustein für die Spermidinsynthese liefert, hemmt. Sowohl Vigabatrin® als auch Eflornithin müssen allerdings in hohen Dosen angewendet werden und besitzen dabei deutliche Nebenwirkungen.

Zusätzlich zu der Wechselwirkung mit an dieser Stelle nicht näher spezifizierbaren Aminotransferasen muß bedacht werden, daß der Mensch ein zur *T. cruzi*-TAT verwandtes Protein besitzt, dessen Fehlfunktion eine Krankheit mit schwerwiegenden Folgen auslösen kann. Ein TAT-Inhibitor muß folglich möglichst *T. cruzi*-spezifisch wirken. Da sich die Symptome des Richner-Hanhart-Syndroms jedoch durch eine tyrosin- und phenylalaninarne Diät unterdrücken lassen (Hunziker, 1980; Rabinowitz, 1995), bliebe die Nützlichkeit von *T. cruzi*-TAT auch bei nur unvollständiger Spezifität unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen bestehen. Um dennoch

eine möglichst hohe Genauigkeit zu erzielen, sollten bei der Ligandenplanung die existierenden Unterschiede zwischen beiden Enzymen effektiv ausgenutzt werden. Kinetische Messungen zeigen Differenzen im Verhalten gegenüber Mono- und Dicarboxy- α -Ketoverbindungen auf, die in dieser Arbeit auf mögliche Unterschiede im Kofaktorbindungsmodus zurückgeführt werden. Aus der *T. cruzi*-TAT-Struktur läßt sich außerdem ableiten, daß neben Dicarboxyverbindungen auch an C β oder C γ verzweigte Aminosäuren nur schlecht mit der besonderen Konformation von PLP im Enzym des Parasiten vereinbar sind (Kap. IV.2.d.2). Dies legt eine Inhibitorentwicklung ausgehend von den Grundstrukturen des Pyruvat/Alanins oder α -Ketomethiobutyrat/Methionins nahe, wobei sich das erste Motiv aber als zu klein und zu weitverbreitet erweisen dürfte, um spezifische Pharmaka zu ermöglichen.

In der Praxis wäre die Aufklärung der Enzymstruktur nicht der erste Schritt bei der Suche nach einem medizinisch nutzbaren TAT-Inhibitor, wenn noch kein Vorwissen über mögliche Wirkstoffe zur Verfügung steht. Vielmehr würden durch den Einsatz von Molekülbibliotheken in Hochdurchsatz-Tests zunächst Leitstrukturen identifiziert, für die im Anschluß nach Verbesserungsmöglichkeiten in Hinblick auf Spezifität und Affinität gesucht würde. Hierbei sind strukturelle Informationen sehr nützlich, denn sie erlauben einen zielgerichteten Eingriff in die Wechselwirkungen des Liganden mit dem Protein. Dazu muß jedoch der Bindungsmodus dieser Moleküle bekannt sein. Zu dessen Ermittlung werden nach Möglichkeit kristallografische Methoden eingesetzt, es können aber auch, wie in dieser Arbeit vorgestellt, Simulationsrechnungen durchgeführt oder Überlegungen in Analogie zu bekannten Enzym/Inhibitor-Strukturen angestellt werden (Kap. IV.2.d.1 und Kap. IV.2.d.2). Da es bisher nicht gelungen ist, mit *T. cruzi*-TAT einen kristallinen Komplex herzustellen, wäre die kristallografische Aufklärung der Substratbindung in diesem Enzym ein wichtiger nächster Schritt. Die Gründe für die Spezifität der *T. cruzi*-TAT könnten im Zuge solcher Experimente mit größerer Sicherheit beantwortet werden, als es Docking-Simulationen (Kap. IV.2.d.1) erlauben. Durch ein mittlerweile etabliertes Expressionssystem zur Herstellung von rekombinanter kristallisierfähiger *T. cruzi*-TAT in *E. coli* werden sich solche weiterführenden Untersuchungen stark vereinfachen (Nowicki & Montemartini-Kalisz, 1999, unveröffentlicht).

In der Ausnutzung von *T. cruzi*-TAT als pharmakologisches Zielmolekül wäre mit der experimentellen Suche nach Leitstrukturen zu beginnen. Die hierfür eingesetzten Hochdurchsatz-Testverfahren sind normalerweise nur bei pharmazeutischen Unternehmen möglich, und es müßte daher nach einem geeigneten Kooperationspartner gesucht werden.

Um Leitmoleküle unter dem Gesichtspunkt der Spezifität zu verbessern, wäre die Aufklärung der Struktur von TAT des Menschen bzw. der Ratte wünschenswert. Hiermit könnten nach Übereinanderlagerung mit der Struktur des parasitären Enzyms Modifikationen an den

potentiellen Wirkstoffen geplant werden, die die Affinität nur für *T. cruzi*-TAT erhöhen und so zu einer Reduzierung von Nebenwirkungen führen. Ein solcher Ansatz ist z.B. für trypanosomiale Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase erfolgreich verfolgt worden (Aronov *et al.*, 1999). Die Klonierung und erfolgreiche Expression von Ratten-TAT ist in der Literatur beschrieben (Dietrich *et al.*, 1991). In *T. cruzi*-TAT besteht ein sehr vielversprechendes Strukturmodell für eine Strukturlösung dieses Proteins mit der Methode des Molekularen Ersatzes. Die Beobachtung, daß die Halbwertszeit der Säugerenzyme über lange terminale Sequenzabschnitte reguliert wird (Stellwagen, 1992; Gross-Mesilaty *et al.*, 1997), die in *T. cruzi*-TAT nicht enthalten sind (Abb. IV.17), und die freie Zugänglichkeit der Termini in der Struktur des Parasitenenzym (Abb. IV.8) legt die Konstruktion eines entsprechend verkürzten Expressionsvektors für die Produktion rekombinanter Ratten-TAT nahe, falls Schwierigkeiten mit der Kristallisation des kompletten Proteins auftreten sollten.

VI. Zusammenfassung

Tyrosin-Aminotransferase aus *T. cruzi*-Epimastigoten wurde mit PEG 4000 und PEG 8000 im pH-Bereich zwischen 6.3 und 7.0 kristallisiert. Die Kristalle gehörten zur Raumgruppe $P 2_1$ mit einem Dimer pro asymmetrischer Einheit (Gitterkonstanten : $a = 61.6$, $b = 102.2$, $c = 77.9$ Å; $\beta = 110.3^\circ$) und streuten am Synchrotron bis zu einer Auflösung von 2.3 Å.

Mehrere Röntgendatensätze wurden sowohl an einer Kupfer-Drehanode als auch am Synchrotron (DESY) mit und ohne Tieftkühlung aufgenommen. Initiale Phasen konnten durch Molekularen Ersatz mit der geschlossenen Struktur von *E. coli*-AsAT (PDB: 1ars; Okamoto *et al.*, 1994) gewonnen werden. Die Struktur der *T. cruzi*-TAT wurde bis zu einer Auflösung von 2.5 Å mit den Reflexen eines Drehanoden-Datensatzes ohne Tieftkühlung verfeinert, da Eisbildung die Verwendung des höchstauflösenden Synchrotron-Datensatzes verhinderte. Das endgültige Modell besitzt einen R-Wert von 15.7 % ($R_{\text{free}} = 21.1$ %). Es enthält neben 825 von 832 Aminosäuren und zwei Lysin-gebundenen PLP-Molekülen noch 118 Wasserreste.

Wie andere Aminotransferasen der Klasse I besitzt das Monomer von *T. cruzi*-TAT eine Zwei-Domänen-Struktur. Die kofaktorbindenden Domäne ist derjenigen von *E. coli*-AsAT, dem Suchmodell im Molekularen Ersatz, sehr ähnlich. Größere Unterschiede ergeben sich in der aus Aminosäuren des N- und des C-Terminus zusammengesetzten substratbindenden Domäne. Hier führen zwei große Insertionen zu einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt, von dem in *E. coli*-AsAT nur die beiden zentralen Stränge enthalten sind. Nach einem strukturbasierten Sequenzalignment wird die Sequenzidentität zwischen beiden Proteinen zu 13 % bestimmt. Besondere Strukturelemente wie z.B. ein drittes cis-Prolin an Position 186 können auch in anderen Klasse-I-Subfamilien identifiziert werden.

Die direkte Bindung des Kofaktor-Pyridiniumringes erfolgt in *T. cruzi*-TAT durch die gleichen Aminosäuren wie in anderen Aminotransferasen. Dabei zeigt das zu einer Schiff'schen Base mit dem Kofaktor verbrückte Lysin eine ungewöhnliche Seitenkettenkonformation, woraus sich ein Einfluß auf die Reaktivität des Enzyms ergeben könnte. Das Stickstoffatom der Schiff'schen Basenbindung ist mit hoher Wahrscheinlichkeit unprotoniert.

Größere Unterschiede zur *E. coli*-AsAT ergeben sich im Phosphatbindungsmodus: im Vergleich zur bakteriellen Aspartat-Aminotransferase ist die Bindungstasche in *T. cruzi*-TAT hydrophober. Infolgedessen nimmt der Kofaktor eine Konformation an, bei der die Phosphatgruppe dichter an der Substratbindungsstelle liegt.

Experimentelle Ansätze zur Bestimmung des Substratbindungsmodus von *T. cruzi*-TAT schlugen fehl. Stattdessen wurden Docking-Simulationsrechnungen durchgeführt sowie Modelle in Analogie zu Komplexen verwandter Aminotransferasen erstellt. Hiernach begründet sich die Präferenz für Tyrosin in einer Wasserstoffbrücke zwischen Asn 17 und der Seitenkette des Substrats. Die Bevorzugung von Pyruvat vor Oxaloacetat bzw. α -Ketoglutarat ergibt sich aus abstoßenden Wechselwirkungen zwischen der zweiten Carboxylatfunktion und der Phosphatgruppe des Kofaktors in Intermediaten der enzymkatalysierten Transaminierungsreaktion. Zudem fehlt im aktiven Zentrum der *T. cruzi*-TAT ein Argininrest, der bei *E. coli*-AsAT und ähnlichen Aminotransferasen zur Fixierung einer negativen Ladung in der Substratseitenkette verwendet wird. Eine Abstoßung durch die Phosphatgruppe ist auch der wahrscheinliche Grund für die Diskriminierung von Aminosäuren mit verzweigter Seitenkette.

Der Effekt von Punktmutationen, die beim Menschen zum Richner-Hanhart-Syndrom führen, wird mit Hilfe eines einfachen *T. cruzi*-TAT-basierten Strukturmodells der humanen Tyrosin-Aminotransferase erklärt.

Aus dem Modell wird ersichtlich, daß sich der PLP-Bindungsmodus wahrscheinlich von dem im Enzym des Parasiten unterscheidet. Im aktiven Zentrum der menschlichen TAT ist ein Glycin gegen einen Cysteinrest ausgetauscht, so daß es zu sterischen Konflikten mit der Position des Kofaktors in *T. cruzi*-TAT kommt. Die Präferenz für α -Ketoglutarat im humanen Protein ist möglicherweise auf diesen Unterschied zurückzuführen.

VII. Literatur

- Ackerman, S.B. & Seed, J.R. (1976). The effects of tryptophol on immune responses and it implications toward trypanosome-induced immunosuppression. *Experientia* **32**, 645-647
- Alexander, F.W.; Sandmeier, E.; Mehta, P.K. & Christen, P. (1994). Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific α , β and γ families. *Eur. J. Biochem.* **219**, 953-960
- Andersson, S.M. & Pispa, J.P. (1982). Purification and properties of human liver tyrosine aminotransferase. *Clin. Chim. Acta* **125**, 117-123
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* **181**, 223-230
- Antson, A.A.; Demidkina, T.V.; Gollnick, P., Dauter, Z.; von Tersch, R.L.; Long, J.; Berezhnoy, S.N.; Phillips, R.S.; Harutyunyan, E.H. & Wilson, K.S. (1993). Three-dimensional structure of tyrosine phenol-lyase. *Biochemistry* **32**, 4195-4206
- Araujo, Z.; El Bouhdidi, A.; Heremans, H.; Van Marck, E.; Castes, M. & Carlier, Y. (1999). Vaccination of mice with a combination of BCG and killed *Leishmania* promastigotes reduces acute *Trypanosoma cruzi* infection by promoting an IFN- γ response. *Vaccine* **17**, 957-964
- Aronov, A.M.; Suresh, S.; Buckner, F.S.; Van Voorhis W.C.; Verlinde, C.L.; Opperdoes, F.R.; Hol, W.G. & Gelb, M.H. (1999). Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4273-4278
- Baird, N.C. & Dewar, M.J.S. (1969). Ground state of sigma-bonded molecules. IV. M.I.N.D.O. method and its applications to hydrocarbons. *J. Chem. Phys.* **50**, 1262-1274
- Baker, D.; Bystroff, C.; Fletterick, R.J. & Agard, D.A. (1993). *PRISM*: Topologically Constrained Phase Refinement for Macromolecular Crystallography. *Acta Cryst.* **D49**, 429-439

- Bergdoll, M.; Remy, M.H.; Cagnon, C.; Masson, J.M. & Dumas, P. (1997). Proline-dependent oligomerization with arm exchange. *Structure* **5**, 391-401
- Berger, B.J.; Dai, W.W.; Wang, H., Stark, R.E. & Cerami, A. (1996). Aromatic amino acid transamination and methionine recycling in trypanosomatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4126-4130
- Berger, B.J.; Dai, W.W. & Wilson, J. (1998). Methionine formation from α -ketomethiobutyrate in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**, 305-312
- Bhat, T.N. (1988). Calculation of an OMIT map. *J. Appl. Cryst.* **21**, 279-281
- Biosym/MSI (1996), *Crystallography Workbench users guide*
- Birolo, L.; Sandmeier, E.; Christen, P. & John, R.A. (1994). The roles of Tyr70 and Tyr225 in aspartate aminotransferase assessed by analysing the effects of mutations on the multiple reactions of the substrate analogue serine *O*-sulphate. *Eur. J. Biochem.* **232**, 859-864
- Birolo, L.; Malashkevich, V.N.; Capitani, G.; De Luca, F.; Moretta, A.; Jansonius, J.N. & Marino, G. (1999). Functional and structural analysis of cis-proline mutants of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. *Biochemistry* **38**, 905-913
- Bodley, A.L. & Shapiro, T.A. (1995). Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and Leishmania. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3726-3730
- Bontempi, E.J., Bua, J., Aslund, L., Porcel, B., Segura, E.L., Henriksson, J., Orn, A., Pettersson, U. & Ruiz, A.M. (1993). Isolation and characterization of a gene from *Trypanosoma cruzi* encoding a 46-kilodalton protein with homology to human and rat tyrosine aminotransferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 253-262
- Borisov, V.V.; Borisova, S.N.; Kachalova, G.S.; Sosfenov, N.I.; Vainshtein, B.K.; Torchinsky, Y.M. & Braunstein, A.E. (1978). Three-dimensional structure at 5 Å resolution of cytosolic aspartate transaminase from chicken heart. *J. mol. Biol.* **125**, 275-292

- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Braunstein, A.E. (1939). *Biokhimiya* **4**, 667-690
- Brünger, A.T. (1990a). Extension of Molecular Replacement: A New Search Strategy based on Patterson Correlation Refinement, *Acta Cryst.* **A46**, 46-57
- Brünger, A.T.; Krukowski, A. & Erickson, J. (1990b). Slow-Cooling Protocols for Crystallographic Refinement by Simulated Annealing. *Acta Cryst.* **A46**, 585-593
- Brünger, A.T. (1992). The Free R Value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature* **355**, 472-474
- Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M., Engel, J.C. & Cannata, J.J.B. (1985). End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**, 329-343
- Cazzulo, J.J. (1992). Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Subcell. Biochem.* **18**, 235-257
- Chatterjee, A.N. & Ghosh, J.J. (1957). Transaminases of *Leishmania donovani*, the causative agent of Kala azar. *Nature* **180**, 1425
- Chothia, C. & Lesk, A.M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **5**, 823-826
- Christen, P. & Metzler, D.E. (1985). *Transaminases. Biochemistry: A Series of Monographs, Vol.II..* John Wiley & Sons, New York
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst D***50**, 760-763
- Cornish-Bowden, A. (1995). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portland Press, London, U.K.

- Cowtan, K. (1994). *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography* **31**, 34-38
- CRC Handbook of Chemistry and Physics. A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data (1987). Herausgeber: Weast, R.C.; Astle, M.J. & Beyer, W.H.. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida
- Croft, S.L. (1997). The current status of antiparasite chemotherapy. *Parasitology* **114**, Suppl: S3-15
- Crother, R.A. & Blow, D.M. (1967). A Method for Positioning a Known Molecule in an Unknown Crystal Structure. *Acta Cryst.* **23**, 544-548
- Cruickshank, D.W.J. (1998). Remarks about protein structure precision. *Materials Structure* **5** (Special Issue A, ECM-18 abstracts), 135-136
- Diaz de Toranzo, E.G.; Castro, J.A.; Franke de Cazzulo, B.M. & Cazzulo, J.J. (1988). Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* **44**, 880-881
- Dietrich, J.B.; Lorber, B. & Kern, D. (1991). Expression of mammalian tyrosine aminotransferase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. Purification to homogeneity and characterization of the enzyme overproduced in the bacteria. *Eur. J. Biochem.* **201**, 399-407
- Dietrich, J.B. (1992). Tyrosine aminotransferase: a transaminase among others? *Cell. Mol. Biol.* **38**, 95-114
- Docampo, R.; Moreno, S.N.; Stoppani, A.O.; Leon, W.; Cruz, F.S.; Villalta, F. & Muniz, R.F. (1981). Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1947-1951
- Douc-Rasy, S.; Kayser, A.; Riou, J.F. & Riou, G. (1986). ATP-independent type II topoisomerase from trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7152-7156
- Drenth, J. (1994). *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer-Verlag, New York

- Eichele, G.; Ford, G.C.; Glor, M.; Jansonius, J.N.; Mavrides, C. & Christen, P. (1979). The three-dimensional structure of mitochondrial aspartate aminotransferase at 4.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **133**, 161-180
- Eisenthal, R. & Cornish-Bowden, A. (1998). Prospects for antiparasitic drugs. The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of African sleeping sickness. *J. Biol. Chem.* **273**, 5500-5505
- El Sawalhy, A. & El-Sherbini, S. (1997). Diagnosis of chronic camel trypanosomosis by detection of the antibody of trypanosome tyrosine aminotransferase. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **104**, 531-533
- El Sawalhy, A., Seed, J.R.; Hall, J.E. & El Attar, H. (1998). Increased excretion of aromatic amino acids catabolites in mammals infected with *Trypanosoma brucei evansi*. *J. Parasitol.* **84**, 469-473
- Esnouf, R.M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph. Model.* **15**, 132-134 & 112-113
- Fair, D.S. & Krassner, S.M. (1971). Alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in *Leishmania tarentolae*. *J. Parasitol.* **18**, 441-444
- Fairlamb, A.H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B.T. & Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* **227**, 1485-1487
- Fellman, J. H.; Vanbellinghen, P. J.; Jones, R. T. & Koler, R. D. (1969). Soluble and mitochondrial forms of tyrosine aminotransferase: relationship to human tyrosinemia. *Biochemistry* **8**, 615-622
- Ferrari, I.; Levin, M.J.; Wallukat, G.; Elies, R.; Lebesgue, D.; Chiale, P.; Elizari, M.; Rosenbaum, M. & Hoebeke, J. (1995). Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human β_1 -adrenergic receptor. *J. Exp. Med.* **182**, 59-65

- Flohé, L. (1998). The Achilles' heel of trypanosomatids: trypanothione-mediated hydroperoxide metabolism. *Biofactors* **8**, 87-91
- French, S. & Wilson, K. (1978). On the Treatment of Negative Intensity Observations. *Acta Cryst.* **A34**, 517-525
- Ford, G.C.; Eichele, G. & Jansonius, J.N. (1980). Three-dimensional structure of a pyridoxal-phosphate-dependent enzyme, mitochondrial aspartate aminotransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2559-2263
- Gehring, H. & Christen, P. (1978). Syncatalytic conformational changes in mitochondrial aspartate aminotransferases. Evidence from modification and demodification of Cys 166 in the enzyme from chicken and pig. *J. Biol. Chem.* **253**, 3158-3163
- Gehring, H.; Sandmeier, E.; Kirsten, H.; Carrassi, R.; Christen, P. & Jansonius, J.N. (1984) Aspartate aminotransferase: studies on conformational adaptations and 3H-transfer during transamination. *Prog. Clin. Biol. Res.* **144B**, 223-231
- Giacovazzo, C.; Monaco, H.L.; Viterbo, D.; Scordari, F.; Gilli, G.; Zanotti, G. & Catti, M. (1992). *Fundamentals of Crystallography*. Herausgeber: Giacovazzo, C.; International Union of Crystallography, Oxford Science Publications
- Gilbert, H.F. (1982). Biological disulfides: the third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* **257**, 12086-12091
- Gilbert, H.F. (1995). Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol.* **251**, 8-28
- Grishin, N.V.; Phillips, M.A. & Goldsmith, E.J. (1995). Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci.* **4**, 1291-1304
- Goldberg, J.M.; Swanson, R.V.; Goodman, H.S. & Kirsch, J.F. (1991). The tyrosine-225 to phenylalanine mutation of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase results in an alkaline transition in the spectrophotometric and kinetic pK_a values and reduced values of both k_{cat} and K_m . *Biochemistry* **30**, 305-312

- Goldberg, J.M. & Kirsch, J.F. (1996). The reaction catalyzed by *Escherichia coli* aspartate aminotransferase has multiple partially rate-determining steps, while that catalyzed by the Y225F mutant is dominated by ketimine hydrolysis. *Biochemistry* **35**, 5280-5291
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. & Metoz, F (1999). ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, im Druck
- Gross-Mesilaty, S.; Hargrove, J.L. & Ciechanover, A. (1997). Degradation of tyrosine aminotransferase (TAT) via the ubiquitin-proteasome pathway. *FEBS Lett.* **405**, 175-180
- Gutteridge, W.E. & Rogerson, G.W. (1979). Biochemical aspects of the biology of *Trypanosoma cruzi*. In: *Biology of the Kinetoplastida, Vol. 2* (Lumsden, W.H & Evans, D.A., Editoren). Academic Press, London, 619-652
- Györgi, P. (1934). Vitamin B₂ and the Pellagra-like Dermatitis in Rats. *Nature* **133**, 448-449
- Hanhart, E. (1947). Neue Sonderformen von Keratosis palmo-plantaris, u.a. eine regelmäßig-dominante mit systematisierten Lipomen, ferner 2 einfach-rezessive mit Schwachsinn und z.T. mit Hornhautveränderungen des Auges (Ektodermatosyndrom). *Dermatologica* **94**, 286-308
- Hargrove, J.L. & Wichman, R.D. (1987). A cystine-dependent inactivator of tyrosine aminotransferase co-purifies with gamma-cystathionase (cystine desulfurase). *J. Biol. Chem.* **262**, 7351-7357
- Hargrove, J.L. (1988). Persulfide generated from L-cysteine inactivates tyrosine aminotransferase. Requirement for a protein with cysteine oxidase activity and γ -cystathionase. *J. Biol. Chem.* **263**, 17262-17269
- Hargrove, J.L.; Scoble, H.A.; Mathews, W.R.; Baumstark, B.R. & Biemann, K. (1989). The structure of tyrosine aminotransferase. Evidence for domains involved in catalysis and enzyme turnover. *J. Biol. Chem.* **264**, 45-53
- Hausmann, K. & Hülsmann, N. (1996). *Protozoology*. Thieme-Verlag, Stuttgart

- Hayashi, H. & Kagamiyama, H. (1997). Transient-state kinetics of the reaction of aspartate aminotransferase with aspartate at low pH reveals dual routes in the enzyme-substrate association process. *Biochemistry* **36**, 13558-13569
- Hayashi, H.; Mizuguchi, H. & Kagamiyama, H. (1998). The imine-pyridine torsion of the pyridoxal 5'-phosphate Schiff base of aspartate aminotransferase lowers its pK_a in the unliganded enzyme and is crucial for the successive increase in the pK_a during catalysis. *Biochemistry* **37**, 15076-15085
- Henikoff, S. & Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10915-10919
- Hennig, M.; Grimm, B.; Contestabile, R.; John, R.A. & Jansonius, J.N. (1997). Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an α_2 -dimeric vitamin B6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4866-4871
- Hester, G.; Stark, W.; Moser, M.; Kallen, J.; Markovic-Housley, Z. & Jansonius, J.N. (1999). Crystal structure of phosphoserine aminotransferase from escherichia coli at 2.3 Å resolution: comparison of the unligated enzyme and a complex with α -methyl-l-glutamate. *J. Mol. Biol.* **286**, 829-850
- Hodel, A.; Kim, S.H. & Brünger, A.T. (1992). Model Bias in Macromolecular Crystal Structures *Acta Cryst. A* **48**, 851-859
- Hoof, R.W.W., Vriend, G., Sander C. & Abola, E.E. (1996). WHAT_CHECK (verification routines from WHAT IF): errors in protein structures. *Nature* **381**, 272
- Hühn, R.; Stoermer, H.; Klingele, B.; Bausch, E.; Fois, A.; Farnetani, M.; Di Rocco, M.; Boue, J.; Kirk, J.M.; Coleman, R. & Scherer, G. (1998). Novel and recurrent tyrosine aminotransferase gene mutations in tyrosinemia type II. *Hum. Genet.* **102**, 305-313
- Hughes, R.C.; Jenkins, W.T. & Fischer, E.H. (1962). The site of binding of pyridoxal-5'-phosphate to heart glutamic-aspartic transaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1615-1618

- Hunziker, N. (1980). Richner-Hanhart syndrome and tyrosinemia type II. *Dermatologica* **160**, 180-189
- Inoue, K.; Kuramitsu, S.; Okamoto, A.; Hirotsu, K.; Higuchi, T.; Morino, Y. & Kagamiyama, H. (1991). Tyr225 in aspartate aminotransferase: contribution of the hydrogen bond between Tyr225 and coenzyme to the catalytic reaction. *J. Biochem. (Tokyo)* **109**, 570-576
- Ivanov V.I & Karpeisky, Y.A. (1968). Dynamic three-dimensional model for enzymatic transamination. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **32**, 21-53
- Iwasaki, M.; Hayashi, H. & Kagamiyama, H. (1994). Protonation state of the active-site Schiff base of aromatic amino acid aminotransferase: modulation by binding of ligands and implications for its role in catalysis. *J. Biochem. (Tokyo)* **115**, 156-161
- Iwasaki, Y; Lamar, C.; Danenberg, K. & Pitot, H.C. (1973). Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. Characterization and metabolic regulation of multiple forms of tyrosine aminotransferase. *Eur. J. Biochem.* **34**, 347-357
- Jäger, J.; Moser, M.; Sauder, U. & Jansonius, J.N. (1994). Crystal structures of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase in two conformations. Comparison of an unliganded open and two liganded closed forms. *J. Mol. Biol.* **239**, 285-305
- Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411
- Jansonius, J.N. (1998). Structure, evolution and action of vitamin B₆-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 759-769
- Jenkins, W.T. & D'Ari, L. (1996). Glutamic-aspartic transaminase. X. Mechanism and order of formation of the enzyme-substrate carboxylate bonds. *J. Biol. Chem.* **241**, 5667-5674
- Jensen, R.A. & Gu, W. (1996). Evolutionary recruitment of biochemically specialized subdivisions of family I within the protein superfamily of aminotransferases. *J. Bacteriol.* **178**, 2161-2171

- Jiang, J.S. & Brünger, A.T. (1994), Protein Hydration Observed by X-ray Diffraction. Solvation Properties of Penicillopepsin and Neuraminidase Crystal Structures. *J. Mol. Biol.* **243**, 110-115
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst A* **47**, 110-119
- Julin, D.A. & Kirsch, J.F. (1989). Kinetic isotope effect studies on aspartate aminotransferase: evidence for a concerted [1,3]-prototropic shift mechanism for the cytoplasmic isozyme and L-aspartate and dichotomy in mechanism. *Biochemistry* **28**, 3825-3833
- Kabsch, W. & Sander, C. (1993). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637
- Kagamiyama, H.; Hayashi, H.; Yano, T.; Mizuguchi, H. & Ishii, S. (1994). In: *Biochemistry of Vitamin B6 and PQQ* (Marino, G.; Sannia, G. & Bossa, F., Herausgeber). Birkhäuser Verlag, Schweiz. 43-47
- Kalisz, H.M. (1997). Persönliche Mitteilung.
- Kallen, J.; Kanai, M.; Marcovic-Housley, Z.; Vincent, M.G. & Jansonius, J.N. (1987). Crystallographic and solution studies on phosphoserine aminotransferase from *Escherichia coli*. In: *Biochemistry of Vitamin B6* (Christen, P. & Korpela, T., Herausgeber). Birkhäuser Verlag, Basel, Schweiz. 157-160
- Kent, A.B.; Krebs, E.G. & Fischer E.H. (1958). Properties of crystalline phosphorylase b. *J. Biol. Chem.* **232**, 549-558
- Kierszenbaum, F. (1999). Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 210-223
- Kirsch, J.F.; Eichele, G.; Ford, G.C.; Vincent, M.G.; Jansonius, J.N.; Gehring, H. & Christen, P. (1984). Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. *J. Mol. Biol.* **174**, 497-525

- Kleywegt, G.J. & Jones, T.A. (1994). "Halloween ... Masks and Bones", in "From First Map to Final Model" (Bailey, S.; Hubbard, R. & Waller, D., Editoren), SERC Daresbury Laboratory, 59-66
- Kleywegt, G.J. (1996a). Use of non-crystallographic symmetry in protein structure refinement. *Acta Cryst.* **D52**, 842-857
- Kleywegt (1996b). Making the most of your search model, *ESF/CCP4 Newsletter* **32**, 32-36.
- Kleywegt, G.J. & Jones, T.A. (1997). Model-building and refinement practice. *Methods in Enzymology* **277**, 208-230
- Kleywegt, G.J. & Jones, T.A. (1998). Databases in protein crystallography. *Acta Cryst.* **D54**, 1119-1131
- Kraulis, P. (1991). A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950
- Kuramitsu, S.; Hiromi, K.; Hayashi, H.; Morino, Y. & Kagamiyama, H. (1990). Pre-steady-state kinetics of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase catalyzed reactions and thermodynamic aspects of its substrate specificity. *Biochemistry* **29**, 5469-5476
- Lamzin, V.S. & Wilson, K.S. (1993). Automated refinement of protein models. *Acta Cryst.* **D49**, 129-147
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993). Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291
- Le Blanq, S.M. & Lanham, S.M. (1984). Aspartate aminotransferase in *Leishmania* is a broad spectrum transaminase. *Trans.Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**, 373-375
- Lippert, B.; Metcalf, B.W.; Jung, M.J. & Casara, P. (1977). 4-amino-hex-5-enoic acid, a selective catalytic inhibitor of 4-aminobutyric-acid aminotransferase in mammalian brain. *Eur. J. Biochem.* **74**, 441-445

- Lucius, R. & Loos-Frank, B. (1997). *Parasitologie. Grundlagen für Biologen Mediziner und Veterinärmediziner*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Malashkevich, V.N.; Jäger, J.; Ziak, M.; Sauder, U.; Gehring, H.; Christen, P. & Jansonius, J.N. (1995). Structural basis for the catalytic activity of aspartate aminotransferase K258H lacking the pyridoxal 5'-phosphate-binding lysine residue. *Biochemistry* **34**, 405-414
- Matthews, B.W. (1968). Solvent Content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497
- McGrath, M.E.; Eakin, A.E.; Engel, J.C.; McKerrow, J.H.; Craik, C.S. & Fletterick, R.J. (1995). The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J. Mol. Biol.* **247**, 251-259
- McPhalen C.A.; Vincent, M.G. & Jansonius, J.N. (1992). X-ray structure refinement and comparison of three forms of mitochondrial aspartate aminotransferase. *J. Mol. Biol.* **225**, 495-517
- Mehta, P.K.; Hale, T.I. & Christen P. (1993). Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur. J. Biochem.* **214**, 549-561
- Metzler, D.E., Ikawa, M. & Snell, E.E. (1954). A General Mechanism for Vitamin B₆-catalyzed Reactions. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 648-652
- Miyahara, I.; Hirotsu, K.; Hayashi, H. & Kagamiyama, H. (1994). X-ray crystallographic study of pyridoxamine 5'-phosphate-type aspartate aminotransferases from *Escherichia coli* in three forms. *J. Biochem. (Tokyo)* **116**, 1001-1012
- Momany, C.; Ernst, S.; Ghosh, R.; Chang, N.L. & Hackert, M.L. (1995). Crystallographic structure of a PLP-dependent ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a to 3.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **252**, 643-655
- Montemartini, M; Santomé, J.A.; Cazzulo, J.J. & Nowicki, C. (1993). Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **292**, 901-906

- Montemartini, M.; Santomé, J.A.; Cazzulo, J.J. & Nowicki, C. (1994a). Production of aromatic α -hydroxy acids by epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, and its possible role in NADH re-oxidation. *FEMS Microbiol. Lett.*; **118**, 89-92
- Montemartini, M.; Santomé, J.A.; Cazzulo, J.J. & Nowicki, C. (1994b). Purification and partial structural and kinetic characterization of an aromatic L- α -hydroxy acid dehydrogenase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**, 15-23
- Montrichard, F.; Le Guen, F.; Laval-Martin, D.L. & Davioud-Charvet, E. (1999). Evidence for the co-existence of glutathione reductase and trypanothione reductase in the non-trypanosomatid Euglenozoa: *Euglena gracilis* Z. *FEBS Lett.* **442**, 29-33
- Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Huey, R. & Olson, A.J. (1996). Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. *J. Computer-Aided Molecular Design* **10**, 293-304
- Munn, D.H.; Zhou, M.; Attwood, J.T.; Bondarev, I.; Conway, S.J.; Marshall, B.; Brown, C. & Mellor, A.L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* **281**, 1191-1193
- Murshudov, G.N.; Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum Likelihood Method. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255
- Nagel, R. (1987). Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. *Mutat. Res.* **191**, 17-20
- Nanavati, S. M. & Silverman, R.B. (1991). Mechanisms of Inactivation of γ -Aminobutyric Acid Aminotransferase by the Antiepilepsy Drug γ -Vinyl GABA (Vigabatrin). *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9341-9343
- Natt, E.; Kida, K.; Odievre, M.; Di Rocco, M. & Scherer, G. (1992). Point mutations in the tyrosine aminotransferase gene in tyrosinemia type II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 9297-9301
- Navaza J. (1994). AMoRe: an Automated Package for Molecular Replacement. *Acta Cryst.* **A50**, 157-163

- Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970). A General Method Applicable to the Search for Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins. *J. Mol. Biol.* **48**, 443-453
- Nicholls, A. Sharp, K.A. & Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**, 281-296
- Nogoceke, E.; Gommel, D.U.; Kieß, M.; Kalisz, H.M. & Flohé, L. (1997). A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.* **378**, 827-836
- Nowicki, C.; Montemartini, M.; Duschak, V.; Santome, J.A. & Cazzulo, J.J. (1992). Presence and subcellular localization of tyrosine aminotransferase and p-hydroxyphenyllactate dehydrogenase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**, 119-124
- Nowicki, C. (1999). Persönliche Mitteilung.
- Okamoto, A.; Higuchi, T.; Hirotsu, K.; Kuramitsu, S. & Kagamiyama, H. (1994). X-Ray Crystallographic Study of Pyridoxal 5'-Phosphate-Type Aspartate Aminotransferases from *Escherichia coli* in Open and Closed Form. *J. Biochem.* **116**, 95-107
- Okamoto, A.; Nakai, Y.; Hayashi, H.; Hirotsu, K. & Kagamiyama, H. (1998). Crystal structures of *Paracoccus denitrificans* aromatic amino acid aminotransferase: a substrate recognition site constructed by rearrangement of hydrogen bond network. *J. Mol. Biol.* **280**, 443-461
- Okamoto, A.; Ishii, S.; Hirotsu, K. & Kagamiyama, H. (1999). The active site of *Paracoccus denitrificans* aromatic amino acid aminotransferase has contrary properties: flexibility and rigidity. *Biochemistry* **38**, 1176-1184
- Ondarza, R.N. (1989). Enzyme regulation by biological disulfides. *Biosci. Rep.* **9**, 593-604
- Ondarza, R.N.; Tamayo, E.M.; Hurtado, G.; Hernandez, E. & Iturbe, A. (1997). Isolation and purification of glutathionyl-spermidine and trypanothione from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **28**, Suppl. 73-75

- Onuffer, J.J. & Kirsch, J.F. (1994). Characterization of the apparent negative co-operativity induced in *Escherichia coli* aspartate aminotransferase by the replacement of Asp222 with alanine. Evidence for an extremely slow conformational change. *Protein Eng.* **7**, 413-424
- Orengo, C.A.; Michie, A.D.; Jones, S.; Jones, D.T.; Swindells, M.B. & Thornton J.M. (1997). CATH - a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure* **5**, 1093-1108
- Otwinowski, Z. (1991). Isomorphous Replacement and Anomalous Scattering. *CCP4 Daresbury Study Weekend*, Daresbury, Warrington, 80-86
- Otwinowski, Z. (1993). Data Collection and Processing. *CCP4 Daresbury Study Weekend*, Daresbury, Warrington
- Oue, S.; Okamoto, A.; Nakai, Y.; Nakahira, M.; Shibatani, T.; Hayashi, H. & Kagamiyama, H. (1997). *Paracoccus denitrificans* aromatic amino acid aminotransferase: a model enzyme for the study of dual substrate recognition mechanism. *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 161-171
- Ponder J.W. & Richards, F.M. (1987). Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *J. Mol. Biol.* **193**, 775-791
- Rabinowitz, L.G.; Williams, L.R.; Anderson, C.E.; Mazur, A. & Kaplan, P. (1995). Painful keratoderma and photophobia: hallmarks of tyrosinemia type II. *J. Pediatr.* **126**, 266-269
- Read, R.J. (1986). Improved Fourier Coefficients for Maps Using Phases from Partial Structures with Errors. *Acta Cryst.* **A42**, 140-149
- Reed, S.G. (1998). Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. *Chem. Immunol.* **70**, 124-143
- Rej, R. (1982). A Convenient Continuous-Rate Spectrophotometric Method for Determination of Amino Acid Substrate Specificity of Aminotransferases: Application to Isoenzymes of Aspartate Aminotransferase. *Anal. Biochem.* **119**, 205-210

- Rhee, S.; Silva, M.M.; Hyde, C.C.; Rogers, P.H.; Metzler, C.M.; Metzler, D.E. & Arnone, A. (1997). Refinement and comparisons of the crystal structures of pig cytosolic aspartate aminotransferase and its complex with 2-methylaspartate. *J. Biol. Chem.* **272**, 17293-17302
- Rice, L.M. & Brünger, A.T. (1994). Torsion Angle Dynamics: Reduced Variable Conformational Sampling Enhances Crystallographic Structure Refinement. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **19**, 277-290
- Richner, H. (1938). Hornhautaffektion bei Keratoma palmare et plantare hereditarium. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **100**, 580-588
- Risler, J.L.; Delorme, M.O.; Delacroix, H. & Henaut, A. (1988). Amino Acid Substitutions in Structurally Related Proteins. A Pattern Recognition Approach. Determination of a New and Efficient Scoring Matrix. *J. Mol. Biol.* **204**, 1019-1029
- Schomburg, D. & Reichelt, J. (1988). BRAGI: A comprehensive protein modeling program system. *J. Mol. Graphics* **6**, 161-165
- Schuller, D.J. (1996). *MAGICSQUASH*: More Versatile Non-crystallographic Averaging with Multiple Constraints. *Acta Cryst.* **D52**, 425-434
- Seed, J.R.; Hall, J.E. & Price, C.C. (1983). A physiological mechanism to explain pathogenesis in African trypanosomiasis. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **7**, 83-94
- Sitkoff, D.; Sharp, K.A. & Honig, B. (1994). Correlating solvation free energies and surface tensions of hydrocarbon solutes. *Biophys. Chem.* **51**, 397-409
- Souza, S.C.; Takahashi, C.S. & da Silva J.S. (1991). Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagasic rodents. *Mutat. Res.* **259**, 139-145
- Stellwagen, R.H. (1992). Involvement of sequences near both amino and carboxyl termini in the rapid intracellular degradation of tyrosine aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 23713-23721

- Stibbs, H.H. & Seed, J.R. (1975a). Metabolism of tyrosine and phenylalanine in *Trypanosoma brucei gambiense*. *Int. J. Biochem.* **6**, 197-203
- Stibbs, H.H. & Seed, J.R. (1975b). Short-term metabolism of ¹⁴C tryptophan in rats infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. *J. Infect. Dis.* **131**, 459-462
- Storici, P.; Capitani, G.; Müller R.; Schirmer, T. & Jansonius, J.N. (1999). Crystal structure of human ornithine aminotransferase complexed with the highly specific and potent inhibitor 5-fluoromethylornithine. *J. Mol. Biol.* **285**, 297-309
- Sussman, J.L., Lin, D., Jiang, J., Manning, N.O., Prilusky, J., Ritter, O. & Abola, E.E. (1998). Protein Data Bank (PDB): database of three-dimensional structural information of biological macromolecules. *Acta. Cryst. D* **54**, 1078-1084
- Swanson, S.M. (1994). Core Tracing: Depicting Connections Between Features in Electron Density. *Acta Cryst. D* **50**, 695-708
- Swindells, M.B. (1995). A procedure for detecting structural domains in proteins. *Prot. Sci.* **4**, 103-112
- Tanford, C. (1962). Contribution of Hydrophobic Interactions to the Stability of the Globular Conformations of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 4240-4247
- Tarleton, R.L. & Zhang, L. (1999). Chagas Disease Etiology: Autoimmunity or Parasite Persistence? *PARASITOLOGY TODAY* **15**, 94-99
- Taylor, M.W. & Feng, G.S. (1991). Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* **5**, 2516-2522
- Teeter, M.M. (1989). The Water Structure Surrounding Proteins. In: *Protein Folding. Deciphering the Second Half of the Genetic Code*. Herausgeber: Gierasch, L.M., King, J.; American Association for the Advancement of Science, 44-54
- Teixeira, A.R.; Silva, R.; Cunha Neto, E.; Santana, J.M. & Rizzo, L.V. (1990). Malignant, non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi*-infected rabbits treated with nitroarenes. *J. Comp. Pathol.* **103**, 37-48

- Ten Eyck, L.F. (1973). Crystallographic Fast Fourier Transforms. *Acta Cryst.* **A29**, 486-492
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
- Tizard, I.; Nielsen, K.H.; Seed, J.R. & Hall, J.E. (1978). Biologically active products from African Trypanosomes. *Microbiol. Rev.* **42**, 664-681
- Toney, M.D.; Hohenester, E.; Cowan, S.W. & Jansonius, J.N. (1993). Dialkylglycine decarboxylase structure: bifunctional active site and alkali metal sites. *Science* **261**, 756-759
- Tong, L. & Rossmann, M.G. (1990). The Locked Rotation Function. *Acta Cryst.* **A46**, 783-782
- Van Voorhis, W.C.; Schlekewy, L. & Trong, H.L. (1991). Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5993-5997
- Urbina, J.A. (1999). Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J. Mol. Med.* **77**, 332-338
- Vellieux, F.M.D. & Dijkstra, B.W. (1997). Computation of Bhat's OMIT maps with different coefficients. *J. Appl. Cryst.* **30**, 396-399
- Velick, S.F. & Vavra, J. (1962). A Kinetic and Equilibrium Analysis of the Glutamic Oxaloacetate Transaminase Mechanism. *J. Biol. Chem.* **237**, 2109-2122
- Wagner, A.F. & Folkers, K. (1964). *Vitamins and Coenzymes*. Interscience Publishers. John Wiley & Sons, New York. 160-193
- Wang, B.C. (1985). Resolution of Phase Ambiguity in Macromolecular Crystallography. *Methods in Enzymology* **115**, 90-112

- Weichsel, A.; Gasdaska, J.R.; Powis, G. & Montfort, W.R. (1996). Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure* **4**, 735-751
- Wendel, S. (1998). Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Curr. Opin. Hematol.* **5**, 406-411
- Westley, J. (1973). Rhodanese. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **39**, 327-368
- WHO (1998). *The World Health Report 1998. Life in the 21st century: a vision for all*. World Health Organization, Genf; s.a.: <http://www.who.int/ctd/>
- Wilson, A.J.C. (1942). Determination of Absolute from Relative X-Ray Intensity Data, *Nature* **150**, 152
- Wizel, B.; Garg, N. & Tarleton, R.L. (1998). Vaccination with trypanomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* **66**, 5073-5081
- Wolde, P.R. ten & Frenkel, D. (1997). Enhancement of Protein Crystal Nucleation by Critical Density Fluctuations. *Science* **277**, 1975-1978
- Wriggers, W. & Schulten, K. (1997). Protein domain movements: detection of rigid domains and visualization of hinges in comparisons of atomic coordinates. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **29**, 1-14
- Yamanishi, T. & Tuboi, S. (1981). The mechanism of the L-cystine cleavage reaction catalyzed by rat liver γ -cystathionase. *J. Biochem. (Tokyo)* **89**, 1913-1921
- Yano, T.; Kuramitsu, S.; Tanase, S.; Morino, Y.; Hiromi, K. & Kagamiyama, H. (1991). The role of His143 in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **266**, 6079-6085
- Yano, T.; Kuramitsu, S.; Tanase, S.; Morino, Y. & Kagamiyama, H. (1992). Role of Asp222 in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase: the amino acid residue which enhances the function of the enzyme-bound coenzyme pyridoxal 5'-phosphate. *Biochemistry* **31**, 5878-5887

-
- Yano, T.; Mizuno, T. & Kagamiyama, H. (1993a). A hydrogen-bonding network modulating enzyme function: asparagine-194 and tyrosine-225 of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. *Biochemistry* **32**, 1810-1815
- Yano, T.; Hinoue, Y.; Chen, V.J.; Metzler, D.E.; Miyahara, I.; Hirotsu, K. & Kagamiyama, H. (1993b). Role of an active site residue analyzed by combination of mutagenesis and coenzyme analog. *J. Mol. Biol.* **234**, 1218-1229
- Yu, P.H. & Nguyen, T.V. (1985). Deuterium isotope effect in the transamination of p-tyrosine by rat liver tyrosine transaminase. *Life Sci.* **37**, 1287-1291
- Zhang, K.Y.J. & Main P. (1990). The Use of Sayre's Equation with Solvent Flattening and Histogram Matching for Phase Extension and Refinement of Protein Structures. *Acta Cryst.* **A46**, 377-381

Anhang

A.1 Chemikalien

Tab. A.1 gibt eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien. Grundsätzlich wurden Substanzen mit dem höchsten kommerziell erhältliche Reinheitsgrad verwendet. Lösungen wurden mit deionisiertem und ultrafiltriertem Wasser aus einer Anlage der Fa. Millipore, Eschborn, hergestellt und normalerweise mit 0.2 µm-Filtern sterilfiltriert bzw. mit ca. 0.02 % NaN_3 versetzt.

Substanz	Verwendung	Hersteller
Ammoniumacetat	K	Riedel-de Haën, Seelze
Ammoniumphosphat	K	Sigma Chemical Co., USA
Ammoniumsulfat	K	Riedel-de Haën, Seelze
Bradford-Lösung	R	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Calciumacetat	K	Aldrich-Chemie, Steinheim
Calciumchlorid	K	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	K	Riedel-de Haën, Seelze & Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	K	Merck, Darmstadt
DTT (D,L-Dithiothreitol)	G, R	Sigma Chemical Co., USA
EDTA (Ethyldiamin- N,N,N',N'-tetraacetat)	G, R	Riedel-de Haën, Seelze
Eichpufferlsg., pH 4, 7, 9	K, R	Merck, Darmstadt
Essigsäure	G, K	Merck, Darmstadt
Ethanol	G	Bakker, Ludwigshafen
Formaldehyd	G	Merck, Darmstadt
Glutardialdehyd	G	Fluka, Schweiz
Glycerin	G, K	Merck, Darmstadt

Substanz	Verwendung	Hersteller
HEPES (3-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piper- azino)-ethansulfonsäure-natrium- salz)	K	Sigma Chemical Co., USA
HMW-Eichkit	G	Pharmacia LKB, Schweden
IEF-Eichkit	G	Pharmacia LKB, Schweden
Imidazol	K	Sigma Chemical Co., USA
Isopropanol	K	Bakker, Ludwigshafen
Kaliumdihydrogenphosphat	K	Riedel-de Haën, Seelze & Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	K	Fluka, Schweiz
α -Ketoglutarat	K	Merck, Darmstadt
Lithiumsulfat	K	Merck, Darmstadt
LMW-Eichkit	G	Pharmacia LKB, Schweden
Magnesiumacetat	K	Fluka, Schweiz
Magnesiumchlorid	K	Fluka, Schweiz
D,L- α -Methylmethionin	K	Sigma Chemical Co., USA
D,L- α -Methyltyrosin	K	Sigma Chemical Co., USA
MPD (2-Methyl-2,4-pentandiol)	K	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	K	Merck, Darmstadt
Natriumazid	K	Aldrich-Chemie, Steinheim
Natriumcarbonat	G	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	K, R	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	K	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat	K	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	G	Merck, Darmstadt
Natriumformiat	K	Merck, Darmstadt
Natiumpyruvat	K	Janssen Chimica, Belgien

Substanz	Verwendung	Hersteller
Natriumthiosulfat	G	Fluka, Schweiz
1-O-Octyl- β -D-glucopyranosid	K	Sigma Chemical Co., USA
1,2,3-Oktantriol	K	Sigma Chemical Co., USA
PEG 400	K	Merck, Darmstadt
PEG 1500	K	Merck, Darmstadt
PEG 4000	K	Merck, Darmstadt
PEG 4000, ultra pure	K	Hampton Research, USA
PEG 8000	K	Fluka, Schweiz
PEG 8000, ultra pure	K	Hampton Research, USA
PIPES (1,4-Piperazin-bis-(ethansulfon- säure)-dinatriumsalz)	K	Sigma Chemical Co., USA
Pyridoxal-5'-Phosphat	K	Sigma Chemical Co., USA
Quecksilber-II-Chlorid	K	Fluka, Schweiz
Silbernitrat	G	Fluka, Schweiz
Trichloressigsäure	G	Riedel-de Haën, Seelze
Triethanolamin	R	Fluka, Schweiz
TRIS (α,α,α -Trishydroxyme- thylmethylamin)	K	Sigma Chemical Co., USA
Zinkacetat	K	Fluka, Schweiz
Zitronensäure	K	Riedel-de Haën, Seelze

Tab. A.1: Verwendete Chemikalien. G: Gelektrophorese, K: Kristallisation, R: Proteinreinigung

A.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Cellulosenitratfilter	0.2 µm	Sartorius, Göttingen
Cellulosenitratfilter	0.2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Dialyseschlauch	12 kDa cutoff	Spectrum Medical Ltd., UK
Gele	10 - 15 % 8 - 25 % IEF, pH 3 - 9	Pharmacia LKB, Schweden
Gelfiltrationsmaterial	Superdex 200	Pharmacia LKB, Schweden
Glaskapillaren	0.1 - 0.7 mm	Hilgenberg, Malsfeld
Klebefolie		Manco Inc., Taiwan
Kristallisationsschalen		Crychem Inc., USA
Ultrafilter	Centricon, 10 kDa	Amicon, USA
Ultrafilter	Centriprep	Amicon, USA

Tab. A.2: Verbrauchsmaterialien

A.3 Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Brutschrank	BK 5060E	Heraeus
Brutschrank	Unichromat 400	Uniequip, Martinsried
Elektrophoresegerät	Phast-System	Pharmacia LKB, Schweden
Feinwaage	1507004	Sartorius, Göttingen
FPLC	LCC-500 Plus MV-7 Frac-100 2 • P-500	Pharmacia LKB, Schweden
Kühlzentrifuge	EBA 12 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Kühlzentrifuge	Sigma 3MK	Sigma Laborzentrifugen, Osterode/Harz
Laborwaage	R200D	Sartorius, Göttingen
Massenspektrometer	REFLEX™ MALDI/TOF	Bruker, Bremen
Mikroskop	Stemi SV 11	Carl Zeiss, Oberkochen
pH-Elektrode	H61	Schott
pH-Meter	CG 822	WTW Weilheim
Pipettierroboter	Biomek 1000	Beckman, USA
Spektralphotometer	4054	Pharmacia LKB, Schweden
Spektralphotometer	Ultrospec 3000	Pharmacia LKB, Schweden
Streulichmeßgerät	DynaPro-801	Protein Solutions Inc. USA

Tab. A.3: Wichtige Laborgeräte

A.4 Röntgenmessungen

Meßplatz:	GBF, Braunschweig	DESY, Hamburg
Generator:	Cu-Drehanode von Siemens (Siemens Analytical X-Ray Instruments Ltd., USA)	Synchrotron, BW 6
Diffraktometer:	Vierkreisdiffraktometer (Siemens Analytical X-Ray Instruments Ltd., USA)	Zweikreisdiffraktometer (Huber Diffraktionstechnik GmbH, Rimsting)
Detektor:	Multiwire-Flächenzähler X1000 (Siemens Analytical X-Ray Instruments Ltd., USA)	Imaging plate mar345 & marccd (mar research, Hamburg)
Kühlsystem:	Siemens Analytical X-Ray Instruments Ltd., USA	CRYOSTREAM (Oxford Cryosystems, UK)

Tab. A.4: Ausstattung der verwendeten Röntgenmeßstationen

A.5 Computer

A.5.a Workstations

Typ	Betriebssystem	Hersteller
DEC 3000/M400	digital Unix 3.2g	Digital Equipment Corp., USA
ALPHA Station 500	digital Unix 4.0a	Digital Equipment Corp., USA
SGI Indigo ² Impact	IRIX 6.x	Silicon Graphics, USA
Octane	IRIX 6.x	Silicon Graphics, USA

A.5.b Personal Computer

Typ	Betriebssystem
IBM kompatibler 486DX100 PC	Windows95
IBM kompatibler PentiumII PC	Windows98

Tab. A.5a/b: Computersysteme

A.6 Sonstige Computerprogramme

Name	Verwendung	Herkunft
CAD	Transformation von Reflexdatensätzen in die asymmetrische Einheit	CCP4, 1994
CELLO	Umwandlung von nichtkristallografischen Symmetrieparametern in verschiedene Formate	Kleywegt, unveröffentlicht
F2MTZ	Umwandlung von X-PLOR-Reflexdatensätzen in MTZ-Format	CCP, 1994
LCF2MTZ	Umwandlung von Drehanodenmeßdaten in MTZ-Format	CCP4, 1994
LSQMAN	Behandlung nichtkristallografischer Symmetrie	Kleywegt, 1996a
MTZ2VARIOUS	Umwandlung von MTZ-Reflexdatensätzen in andere Formate	CCP4, 1994
SEAMAN	Manipulation von Modellstrukturen für Molekularen Ersatz	Kleywegt, 1996b
SORTMTZ	Sortieren von Reflexdatensätzen im MTZ-Format	CCP4, 1994

A.7 Kristallisations-Screens**A.7.a Salz-Screen**

Ansatz-Nr.	Fällungsmittel	Puffer (0.1 M)
1	0.4 M K,Na-Tartrat	
2	0.4 M (NH ₄) ₃ PO ₄	
3	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	TRIS, pH 8.5
4	1.4M Na-Acetat	PIPES, pH 6.5
5	1.0 M (NH ₄) ₃ PO ₄	Citrat, pH 5.6
6	1.5 M Li ₂ SO ₄	HEPES, pH 7.5
7	1.0 M Na-Acetat	Imidazol, pH 7.5
8	0.8 M K,Na-Tartrat	HEPES, pH 7.5
9	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	
10	4.0 M Na-Formiat	
11	2.0 M Na-Formiat	Acetat, pH 4.6
12	1.6 M Na,K-PO ₄	HEPES, pH 7.5
13	1.4 M Na-Citrat	HEPES, pH 7.5
14		
15	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	Acetat, pH 4.6
16	2.0 (NH ₄) ₂ SO ₄	TRIS, pH 7.5

A.7.b PEG-Screen

Ansatz-Nr.	Fällungsmittel*	Zusatz	Puffer (0.1 M)
1	30 % MPD	CaCl ₂ , 0.02 M	Acetat, pH 4.6
2	40 % MPD	Na-Citrat, 0.2 M	HEPES, pH 7.5
3	30 % Isopropanol	Na-Citrat, 0.2 M	PIPES, pH 6.5
4	30 % PEG 4000	NH ₄ -Acetat, 0.2 M	Citrat, pH 5.6
5	30 % PEG 4000	NH ₄ -Acetat, 0.2 M	Acetat, pH 4.6
6	30 % PEG 8000	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.2 M	PIPES, pH 6.5
7	30 % PEG 4000	Li ₂ SO ₄ , 0.2 M	TRIS, pH 8.5
8	20 % PEG 8000	Mg-Acetat, 0.2 M	PIPES, pH 6.5
9	25 % PEG 4000	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.2 M	Acetat, pH 4.6
10	30 % MPD	Mg-Acetat, 0.2 M	PIPES, pH 6.5
11	30 % PEG 4000	Na-Acetat, 0.2 M	TRIS, pH 8.5
12	30 % MPD	NH ₄ -Acetat, 0.2 M	Citrat, pH 5.6
13	30 % PEG 4000	Na-Acetat, 0.2 M	PIPES, pH 6.5
14	30 % PEG 8000	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.2 M	
15	30 % PEG 4000	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.2 M	
16	8 % PEG 8000		TRIS, pH 8.5
17	8 % PEG 4000		Acetat, pH 4.6
18	20 % PEG 8000		K-PO ₄ **, pH 7.5
19	18 % PEG 8000	Zn-Acetat, 0.2 M	PIPES, pH 6.5
20	18 % PEG 8000	Ca-Acetat, 0.2 M	PIPES, pH 6.5
21	2 % PEG 8000	Li ₂ SO ₄ , 0.2 M	
22	15 % PEG 8000	Li ₂ SO ₄ , 0.2 M	

*: Konzentration in (w/w)-%

** Konzentration 0.05 M

A.7.c Gemischter Screen

Ansatz-Nr.	Fällungsmittel*	Zusatz	Puffer (0.1 M)
1	30 % PEG 4000	MgCl ₂ , 0.2 M	TRIS, pH 8.5
2	30 % Isopropanol	MgCl ₂ , 0.2 M	HEPES, pH 7.5
3	30 % PEG 400	Na-Citrat, 0.2 M	TRIS, pH 8.5
4	28 % PEG 400	CaCl ₂ , 0.2 M	HEPES, pH 7.5
5	30 % Isopropanol	NH ₄ -Acetat, 0.2 M	TRIS, pH 8.6
6	30 % PEG 400	MgCl ₂ , 0.2 M	HEPES, pH 7.5
7	20 % Isopropanol	CaCl ₂ , 0.2 M	Acetat, pH 4.6
8	20 % Isopropanol	Na-Citrat, 0.2 M	HEPES, pH 7.5
9	2 % PEG 400	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 2.0 M	HEPES, pH 7.5
10	20 % PEG 4000	Isopropanol, 20 %*	Citrat, pH 5.6
11	20 % PEG 4000	Isopropanol, 10 %*	HEPES, pH 7.5
12	20 % PEG 1500		

*: Konzentration in (w/w)-%

Lebenslauf

Daten zur Person

Name: Wulf Blankenfeldt
Geburtsdatum: 16. Mai 1968
Geburtsort: Ostercappeln, Landkreis Osnabrück
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Ulrich & Beate Blankenfeldt, geb. Petry

Schulausbildung:

08.1974 - 07.1978 Grundschule Bad Essen
09.1978 - 07.1980 Orientierungsstufe Bad Essen
08.1980 - 05.1987 Gymnasium Bad Essen
05.1987 Abitur

Wehrdienst:

07.1987 - 09.1988 Luftwaffenmusikkorps 4, Hamburg

Studium:

10.1988 - 03.1995 Chemiestudium an der Technischen Universität Braunschweig:
12.1990 Vordiplom
09.1992 - 08.1993 Chinesisch-/Chemiestudium an der National Taiwan Normal University Taipei, Taiwan (R.O.C.); beurlaubt an der Technischen Universität Braunschweig
03.1995 Diplom,
Titel der Diplomarbeit: *“Die Struktur von Helodermin, einem Peptid der VIP/Sekretin-Familie, in wäßriger Lösung und Bestimmung von geeigneten Bedingungen für NMR-spektroskopische Untersuchungen des Wachstumsfaktors VEGF-121”,* angefertigt in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig
05.1995 Beginn der Arbeiten für die Dissertation

Berufstätigkeit:

05.1995 - 04.1998 Wissenschaftliche Hilfskraft an der GBF in Braunschweig
06.1998 - 11.1998 Wissenschaftliche Hilfskraft an der GBF in Braunschweig

Stipendien:

04.1989 - 03.1995 Studienstiftung des deutschen Volkes
09.1992 - 08.1993 Taiwanstipendium für Nicht-Sinologiestudenten der Studienstiftung des deutschen Volkes

Weitere Veröffentlichungen

- Blankenfeldt, W.; Nokihara, K.; Naruse, S.; Lessel, U.; Schomburg, D. & Wray, V. (1996). NMR Spectroscopic Evidence That Helodermin, unlike Other Members of the Secretin/VIP Family of Peptides, Is Substantially Structured in Water. *Biochemistry* **35**, 5955-5962
- Blankenfeldt, W.; Liao, J.W.; Lo L.C. & Yeh, M.C.P. (1996). Sequential Additions of Nucleophiles to Tricarbonyl(η^4 -cycloheptadienyl)iron Tetrafluoroborate. *Tetrahedron Lett.* **37**, 7361-7364
- Wray, V.; Blankenfeldt, W.; Nokihara, K. & Naruse, S. (1996). Solution structure comparison of the VIP/PACAP family of peptides by NMR spectroscopy. *Pept. 1996, Proc. Eur. Pept. Symp., 24th* (Pub. 1998; Ramage, R. & Epton, R., Eds.), 921-922
- Völkel, D.; Blankenfeldt, W. & Schomburg, D. (1998). Large-scale production, purification and refolding of the full length prion protein from Syrian golden hamster in *Escherichia coli* using the glutathione S-transferase-fusion system. *Eur. J. Biochem.* **251**, 462-471